

Justa María Poveda Colado

**EFEECTO DE LA UTILIZACIÓN DE
DISTINTOS CULTIVOS INICIADORES
EN LA PROTEOLISIS DEL QUESO
MANCHEGO. OTROS ASPECTOS DE
LA MADURACIÓN**

I.S.B.N. Ediciones de la UCLM
978-84-8427-559-6



Ediciones de la Universidad
de Castilla-La Mancha

Cuenca, 2007



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos

**EFFECTO DE LA UTILIZACIÓN DE DISTINTOS
CULTIVOS INICIADORES EN LA PROTEOLISIS
DEL QUESO MANCHEGO. OTROS ASPECTOS
DE LA MADURACIÓN**

JUSTA M^a POVEDA COLADO

**TESIS DOCTORAL
Ciudad Real, 2001**



**UNIVERSIDAD DE
CASTILLA - LA MANCHA**

Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos

Facultad de Ciencias Químicas

**EFFECTO DE LA UTILIZACIÓN DE DISTINTOS
CULTIVOS INICIADORES EN LA PROTEOLISIS
DEL QUESO MANCHEGO. OTROS ASPECTOS
DE LA MADURACIÓN**

por

Justa M^a Poveda Colado

Visado en Ciudad Real, a 10 de julio de 2001

Fdo. Lourdes Cabezas Redondo
Profesora Titular del
Departamento de Química
Analítica y Tecnología de
Alimentos de la Universidad
de Castilla-La Mancha

Trabajo presentado para optar al Grado de
Doctor en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Fdo. Justa M^a Poveda Colado
Licenciada en Ciencia y Tecnología de Alimentos



**UNIVERSIDAD DE
CASTILLA - LA MANCHA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

JOSE MARÍA LEMUS GALLEGO, Profesor Titular de Universidad y Secretario del Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Castilla-La Mancha,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado “Efecto de la utilización de distintos cultivos iniciadores en la proteólisis del queso manchego. Otros aspectos de la maduración” constituye la Tesis Doctoral que presenta **D^a. Justa M^a Poveda Colado** para aspirar al Grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de Alimentos, y ha sido realizado en los laboratorios de este Departamento bajo la dirección de la profesora **Dra. D^a. Lourdes Cabezas Redondo**.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Ciudad Real a diez de julio de dos mil uno.

Vº Bº

Fdo. María Dolores Cabezudo Ibáñez
Directora del Departamento

Fdo. José María Lemus Gallego
Secretario del Departamento

A Pedro
y a nuestro hijo

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas que de una manera u otra han contribuido a la realización de esta tesis doctoral.

A la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, por la concesión de una beca predoctoral, que aportó la financiación y los medios necesarios.

A la directora de esta tesis, la Dra. Lourdes Cabezas, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos, por brindarme sus conocimientos y su confianza.

A la Dra. María Dolores Cabezudo, Directora del Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos, por su aportación crítica y su orientación.

Al Dr. Javier Fontecha, del Instituto del Frío (CSIC) por haberme asesorado en el método de análisis de los ácidos grasos y al Dr. Pedro J. Martín-Álvarez, del Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC) por su ayuda en el tratamiento estadístico de una parte de los resultados.

Al Dr. Paul McSweeney, Profesor del University College Cork, en Cork, Irlanda, por haberme aceptado para formar parte de su equipo investigador durante la estancia realizada en su Departamento.

A los doctores Marisol Pérez-Coello, por su ayuda en la cromatografía de gases y a Miguel Ángel González-Viñas, por su colaboración en el Análisis Sensorial.

A todos los compañeros del Area de Tecnología de Alimentos, profesores, becarios, etc., que en todo momento se interesaron por mi trabajo y me animaron.

A toda mi familia, por su apoyo incondicional y por sus palabras de ánimo en los momentos difíciles.

Finalmente, a Pedro, mi marido, por su ayuda, su paciencia, su apoyo moral y por su cariño durante estos años, y a mi hijo, porque él también ha soportado el trabajo duro de este último año.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL SOBRE EL QUESO. EL QUESO MANCHEGO

| | |
|---|-----------|
| 1.1. Aspectos históricos..... | 3 |
| 1.2. Proceso de fabricación del queso..... | 7 |
| 1.2.1. Selección y pretratamiento de la leche para la fabricación de queso..... | 7 |
| 1.2.2. Acidificación..... | 8 |
| 1.2.3. Coagulación | 10 |
| 1.2.4. Corte y desuerado | 12 |
| 1.2.5. Salado..... | 12 |
| 1.2.6. Maduración | 13 |
| 1.3. Bioquímica de la maduración del queso | 15 |
| 1.3.1. Metabolismo de los hidratos de carbono (glucolisis) | 15 |
| 1.3.1.1. Metabolismo de la lactosa por las bacterias lácticas..... | 15 |
| 1.3.1.2. Metabolismo del lactato por las bacterias lácticas | 18 |
| 1.3.1.3. Metabolismo del citrato | 19 |
| 1.3.2. Lipólisis | 20 |
| 1.3.2.1. Agentes lipolíticos | 20 |
| 1.3.2.2. Catabolismo de los ácidos grasos | 22 |
| 1.3.2.3. Técnicas de análisis para el estudio de la lipólisis | 25 |
| 1.3.3. Proteólisis..... | 26 |
| 1.3.3.1. Agentes proteolíticos | 26 |
| 1.3.3.2. Catabolismo de los aminoácidos..... | 30 |
| 1.3.3.3. Técnicas para la evaluación de la proteólisis en el queso | 31 |
| 1.4. Quesos de oveja: El queso Manchego | 41 |
| 1.4.1. El queso Manchego..... | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 1.4.1.1. Proceso de fabricación..... | 46 |
| 1.4.2. Revisión bibliográfica sobre el queso Manchego..... | 52 |
| 1.5. Bibliografía | 59 |
| 1.6. Justificación del trabajo..... | 81 |
| CAPÍTULO 2: INFLUENCIA DE LA ÉPOCA DE ELABORACIÓN EN LA PREDICCIÓN DEL TIEMPO DE MADURACIÓN DEL QUESO MANCHEGO | |
| 2.1. Introducción: estado actual del tema | 85 |
| 2.2. Material y Métodos | 87 |
| 2.2.1. Material Experimental | 87 |
| 2.2.2. Análisis físico-químicos | 87 |
| 2.2.2.1. Determinación de la actividad del agua..... | 87 |
| 2.2.2.2. Determinación del pH..... | 88 |
| 2.2.2.3. Determinación del extracto seco..... | 88 |
| 2.2.2.4. Determinación de cloruros..... | 88 |
| 2.2.2.5. Determinación de nitrógeno y proteína totales..... | 89 |
| 2.2.2.6. Determinación de grasa | 89 |
| 2.2.3. Estudio de la proteólisis..... | 89 |
| 2.2.3.1. Electroforesis en gel de urea-poliacrilamida | 89 |
| 2.2.3.2. Fracciones nitrogenadas | 93 |
| 2.2.3.3. Determinación de tirosina y triptófano..... | 94 |
| 2.2.4. Tratamiento estadístico..... | 95 |
| 2.3. Resultados y Discusión..... | 97 |
| 2.3.1. Análisis físico-químicos | 97 |

| | |
|--|------------|
| 2.3.2. Proteolisis experimentada por las muestras de queso | 104 |
| 2.3.2.1. Electroforesis en gel de urea-poliacrilamida..... | 104 |
| 2.3.2.2. Fracciones nitrogenadas | 107 |
| 2.3.2.3. Contenido en tirosina y triptófano | 113 |
| 2.3.3. Análisis Factorial en Componentes Principales..... | 117 |
| 2.3.4. Predicción del tiempo de maduración del queso Manchego..... | 119 |
| 2.4. Conclusiones..... | 131 |
| 2.5. Bibliografía..... | 133 |
| CAPÍTULO 3: LIPOLISIS EN EL QUESO MANCHEGO: ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS GRASOS LIBRES A LO LARGO DE LA MADURACIÓN Y SEGÚN LA ÉPOCA DE FABRICACIÓN | |
| 3.1. Introducción: estado actual del tema..... | 139 |
| 3.2. Material y Métodos..... | 143 |
| 3.2.1. Material experimental | 143 |
| 3.2.2. Método de extracción de los ácidos grasos libres..... | 143 |
| 3.2.3. Análisis por cromatografía de gases | 145 |
| 3.2.4. Tratamiento estadístico | 148 |
| 3.3. Resultados y Discusión | 149 |
| 3.3.1. Contenido en ácidos grasos libres..... | 149 |
| 3.3.2. Estudio de la evolución de los ácidos grasos libres con el tiempo de maduración | 152 |
| 3.3.3. Estudio de la concentración de los ácidos grasos libres según la época de elaboración (primavera, otoño e invierno) | 154 |
| 3.3.4. Contenido en ácidos grasos de la fracción triglicérica | 164 |
| 3.4. Conclusiones..... | 169 |

3.5. Bibliografía 171

CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE LA UTILIZACIÓN DE DISTINTOS CULTIVOS INICIADORES EN EL QUESO MANCHEGO. USO DE *Lactobacillus plantarum* COMO CULTIVO ADJUNTO DEL STARTER

4.1. Introducción..... 179

4.1.1. Cultivos iniciadores o *starters* 185

4.2. Material y Métodos 191

4.2.1. Preparación de los cultivos 191

4.2.2. Elaboración de los quesos. 192

4.2.3. Preparación de las muestras para el análisis..... 193

4.2.4. Análisis microbiológico..... 193

4.2.4.1. Preparación de las muestras para el análisis microbiológico ... 193

4.2.4.2. Recuento de bacterias viables totales 194

4.2.4.3. Recuento de lactococos 194

4.2.4.4. Recuento de leuconostoc 194

4.2.4.5. Recuento de lactobacilos 194

4.2.5. Análisis físico-químicos 195

4.2.6. Estudio de la proteólisis..... 195

4.2.6.1. Fracción de nitrógeno soluble en agua 195

4.2.6.2. Fracción de nitrógeno soluble en agua a pH 4,6..... 195

4.2.6.3. Fracción de nitrógeno soluble en etanol al 70% 196

4.2.6.4. Fracción de nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% .. 196

4.2.6.5. Electroforesis en gel de urea-poliacrilamida 196

| | |
|---|------------|
| 4.2.6.6. Análisis de los péptidos de las fracciones insoluble y soluble en etanol al 70% por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) | 199 |
| 4.2.6.7. Análisis de aminoácidos libres | 200 |
| 4.2.7. Análisis sensorial | 201 |
| 4.2.7.1. Análisis Sensorial Descriptivo | 201 |
| 4.2.8. Análisis estadístico | 202 |
| 4.3. Resultados y Discusión | 207 |
| 4.3.1. Análisis Microbiológico | 207 |
| 4.3.1.1. Leche | 207 |
| 4.3.1.2. Queso | 208 |
| 4.3.2. Análisis físico-químicos | 211 |
| 4.3.3. Electroforesis en gel de urea-poliacrilamida | 216 |
| 4.3.4. Fracciones nitrogenadas | 218 |
| 4.3.5. Análisis de los péptidos de las fracciones insoluble y soluble en etanol al 70% por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) | 223 |
| 4.3.5.1. Fracción de nitrógeno insoluble en etanol al 70% | 224 |
| 4.3.5.2. Fracción de nitrógeno soluble en etanol al 70% | 235 |
| 4.3.6. Análisis de aminoácidos libres | 249 |
| 4.3.7. Análisis sensorial | 262 |
| 4.4. Conclusiones | 269 |
| 4.5. Bibliografía | 273 |

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

SOBRE EL QUESO.

EL QUESO MANCHEGO.

1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS

La fabricación del queso se remonta a la Prehistoria; algunos historiadores afirman que la fabricación de queso se originó en el valle del Tigris-Eúfrates hace más de 8000 años en lo que ahora se conoce como Irak. Fue necesaria la domesticación de los animales para que el hombre descubriera el ordeño y con ello, la producción de leche, para finalmente obtener el queso. El queso fue primeramente producido por la acidificación natural de la leche (debido a la producción de ácido láctico por microorganismos contaminantes) con la consiguiente formación de un coágulo, que una vez roto se separó en cuajada y suero. El suero podía ser consumido inmediatamente, mientras que la cuajada se conservaba mediante el salado, el secado al aire o por la acción combinada de ambos. El ácido láctico, por tanto, parece haber sido el primer agente coagulante de la leche. Con el almacenamiento de la leche en sacos hechos a partir del estómago de animales, pronto se descubrió que algún agente en él causaba la coagulación de la leche de una forma más rápida. Así, el coagulante exógeno (cuajo) fue introducido por primera vez en la elaboración del queso (Holsinger *et al.*, 1995).

La fabricación del queso acompañó a la expansión de la civilización a través de Oriente Medio, Grecia y Roma. Hay datos que se remontan a las civilizaciones mediterráneas (Egipto, Mesopotamia, etc.) donde se han descubierto en diversas tumbas, jeroglíficos, relieves, vasijas, etc., referentes a la cría del ganado y el ordeño. También existen numerosas referencias de la producción de queso en la Biblia y en la literatura de la Grecia y Roma clásicas. En España hay referencias sobre el conocimiento del queso por las distintas civilizaciones que poblaron la Península. Historiadores de la Roma clásica como Diodoro y el mismo Columela ofrecen su testimonio de la actividad ganadera y la producción de quesos en la Península, estos últimos muy apreciados en las mesas romanas, principalmente los del “Campo Espartario”, nombre con el que los romanos conocían la región de La Mancha. La expansión del Imperio Romano fue de especial importancia en la introducción del queso en nuevas zonas geográficas.

Con la llegada de la Edad Media comienza una época oscura para la elaboración del queso. Son los monjes de los monasterios españoles, franceses e italianos

los que recogieron las principales técnicas queseras en pequeños tratados. Muchas de las variedades que aún son populares hoy en día, como Saint Paulin, Wensleydale, Port du Salut y Trappist, tuvieron su origen en los monasterios. En nuestro país, el primer documento en castellano que se conoce referente al queso es una “Nodicia de Kesos”, del convento de San Justo y Pastor, en Rozuela (León), del año 959.

La elaboración del queso se mantuvo esencialmente como un arte hasta que se empezaron a realizar los primeros intentos para estandarizar el procedimiento. Es durante los siglos XVII y XVIII, cuando la fabricación de queso sufre los cambios más importantes, apareciendo las primeras queseras con grandes capacidades de producción, que incorporan los más modernos adelantos en maquinaria y técnicas de elaboración, produciendo quesos muy uniformes en líneas automatizadas con escasa mano de obra. Paralelamente subsisten, con grandes dificultades, pequeñas queseras que conservan la tradición, ofreciendo al consumidor una gran variedad de tipos, aromas y sabores más naturales y menos uniformizados. Muchos de estos quesos siguen teniendo un carácter meramente local, ligados a pequeñas poblaciones montañosas, formando parte de su patrimonio cultural, conservando su rusticidad y características primitivas, pese al tiempo transcurrido.

La transmisión de los “métodos de fabricación” de forma oral primero, y después por escrito, el desconocimiento de la composición exacta de los ingredientes y las transformaciones físicas y químicas de las que dependería la calidad final fueron la causa de que la fabricación de queso fuera, hasta la mitad del siglo XIX, más un arte que una ciencia. Es a partir de esta época cuando el queso entra en la era científica y tecnológica, como consecuencia de los descubrimientos científicos de diversos investigadores.

En nuestros días, el queso se produce fundamentalmente en fábricas altamente automatizadas en toda Europa, y en países que en el pasado fueron poblados por emigrantes europeos, como Estados Unidos, Canadá, Australia y Nueva Zelanda (Fox, 1993; Holsinger *et al.*, 1995).

Los primitivos orígenes en la elaboración del queso y la aplicación de una ciencia artesana en su fabricación, han dado origen a más de 900 nombres diferentes, aunque posiblemente muchos de ellos son similares y se pueden agrupar en 18 tipos naturales (Robinson, 1979). De ahí la gran dificultad de ofrecer una definición de queso que recoja las características de todas las variedades.

El Código Alimentario Español (Anónimo, 1991) define el queso como el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido por separación del suero después de la coagulación de la leche natural, de la desnatada total o parcialmente, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, con o sin hidrólisis previa de la lactosa.

Existen numerosas clasificaciones para los diferentes tipos de quesos en base a distintos criterios:

- procedencia de la leche: quesos de leche de vaca, de oveja, de cabra o de mezclas de estas tres leches
- sistema de elaboración: quesos artesanos e industriales
- contenido en humedad: quesos blandos, semiduros o semiblandos y quesos duros
- contenido en grasa: quesos desnatados (<10% en grasa), semidesnatados (mínimo 10%), magros (<20%), semigrasos (>20%), grasos (>40%), extragrasos (>45%) y doble grasos (>60%)
- maduración: quesos curados o madurados, quesos madurados con mohos, quesos frescos y quesos blancos pasteurizados

1.2. PROCESO DE FABRICACIÓN DEL QUESO

La producción de la mayoría de las variedades de queso puede dividirse en dos fases bien definidas: elaboración y maduración. Mientras que algunas variedades de quesos se consumen frescas, sin ningún período de maduración (Cottage, crema de queso), la mayoría de las variedades de queso experimentan una serie de complejas reacciones bioquímicas durante la maduración, las cuales, si se producen debidamente, dan lugar a un producto con un sabor, un olor y una textura agradables. La bioquímica de la maduración del queso y el desarrollo del sabor se discutirán más adelante.

La elaboración del queso consiste básicamente en un proceso de deshidratación, donde la grasa y la caseína de la leche se concentran entre 6 a 12 veces, dependiendo de la variedad. Las etapas fundamentales que tienen lugar durante la fabricación del queso son (1) acidificación; (2) coagulación; (3) desuerado o sinéresis; (4) moldeado y prensado; (5) salado. La cantidad de humedad retenida en la cuajada está influenciada por el grado y la extensión en que se producen estas 5 etapas, junto con la composición química de la leche. Los fenómenos bioquímicos que tienen lugar durante la maduración están regulados por el pH, la humedad, el contenido en sal y la microbiota del queso. Estos factores, por tanto, condicionan el sabor, el aroma y la textura del queso madurado. La acción conjunta de la acidificación, la deshidratación y el salado de la cuajada, junto con la producción de sustancias inhibitorias por las bacterias que forman parte del cultivo iniciador o *starter* y las condiciones anaeróbicas que tienen lugar en la cuajada durante la maduración, previenen el crecimiento de bacterias indeseables y así el queso se mantiene en adecuadas condiciones a lo largo de la maduración, que puede oscilar entre 2-3 semanas hasta 2 años o incluso más tiempo (Fox, 1993).

1.2.1. Selección y pretratamiento de la leche para la fabricación de queso

En la industria, la elaboración del queso comienza con la selección de leche de alta calidad microbiológica y química. En la práctica, la leche se almacena a 4 °C; en algunos casos (cuando la leche se va a almacenar durante largos períodos de tiempo) se realiza la termización de la misma para minimizar el crecimiento de bacterias psicrótrofas. A

continuación la leche se pasteuriza (72 °C, 15 s) y en el caso de algunas variedades de queso se estandariza (hasta un cierto valor de la relación caseína/grasa) justo antes de su utilización. La pasteurización de la leche destruye gran parte de la microbiota nativa, incluidas bacterias patógenas potenciales y otras bacterias no deseadas. Junto con la estandarización, la pasteurización permite la producción de un queso de calidad más uniforme (Fox, 1993).

La pasteurización de la leche afecta a la proteólisis durante la maduración del queso, fundamentalmente, a través de sus efectos en la microbiota nativa; sin embargo, la pasteurización también origina una ligera desnaturalización de las proteínas del suero, las cuales interactúan con las caseínas (vía formación de enlaces intermoleculares disulfuro) y son incorporadas a la cuajada (Leaver *et al.*, 1995). Se cree que la presencia en el queso de proteínas del suero desnaturalizadas puede afectar negativamente a la accesibilidad de las caseínas a las proteinasas durante la maduración (Lau *et al.*, 1991).

Aunque la leche pasteurizada es la que más se utiliza para la fabricación de queso a escala industrial, todavía se usa leche cruda para la fabricación de algunos quesos denominados quesos artesanos.

1.2.2. Acidificación

La acidificación es uno de los pasos más importantes en la fabricación de la mayoría de las variedades de queso. Consiste en la fermentación de la lactosa hasta la formación de ácido láctico, producida por la inoculación de las bacterias lácticas starter, o en una fabricación tradicional, por las bacterias lácticas nativas presentes en la leche cruda. En este último caso, sin embargo, la producción de ácido láctico es a menudo impredecible, y como la microbiota de la leche es muy heterogénea, con frecuencia se produce el desarrollo de una microbiota indeseable, lo cual da lugar a la producción incontrolada de gas y a la aparición de sabores anormales e indeseables en el queso. Por estas razones, la adición de un cultivo iniciador o starter se ha convertido en una práctica universal.

Los cultivos iniciadores o *starter* están formados por microorganismos mesófilos y termófilos, cuya temperatura óptima de crecimiento, desde un punto de vista práctico, está por debajo y por encima de los 35 °C, respectivamente. Los cultivos iniciadores mesófilos más comunmente utilizados en la industria son *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, mientras que los termófilos son *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus helveticus* u otras especies de lactobacilos. Como adjuntos del cultivo iniciador se han utilizado distintas especies de bacterias, como especies de *Leuconostoc*, de *Lactobacillus* y también la especie *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Estas bacterias son generalmente añadidas a la leche en bajas concentraciones, y por tanto, no contribuyen significativamente a la producción de ácido durante la fabricación. Los cultivos mesófilos de cepas definidas normalmente contienen una mezcla de 2 a 6 cepas seleccionadas y se preparan utilizando prácticas de cultivo que minimizan la aparición de fagos.

Las bacterias lácticas desempeñan desde el comienzo uno de los papeles más importantes en la elaboración del queso. El ácido láctico producido por dichas bacterias no sólo es capaz de coagular por sí mismo la leche, sino que también favorece la acción del cuajo en una coagulación mixta.

El índice y la extensión de la producción de ácido tiene un papel importante en varios aspectos de la fabricación y de la maduración del queso, entre ellos: 1) la actividad del cuajo durante la fabricación; 2) el grado de retención de cuajo en la cuajada; 3) la consistencia de la cuajada y el grado de sinéresis de la misma; 4) el grado de solubilización de fosfato cálcico en la cuajada (lo cual afecta a la susceptibilidad de las caseínas a la proteólisis y a las propiedades reológicas del queso; 5) la inhibición del crecimiento de NSLAB (non starter lactic acid bacteria), así como de patógenos y de bacterias productoras de gas.

El pH de la cuajada desciende al final de la fabricación hasta alcanzar valores entre 4,6-5,1, sin embargo, el intervalo de tiempo requerido para alcanzar el pH final depende de la variedad de queso. Esta variación tiene origen en las diferencias en la cantidad de cultivo iniciador añadido a la leche (0,2-5% v/v), el tiempo de cocción durante la

fabricación, el estado de la cuajada durante la elaboración, el nivel al cual se sala ésta y el grado de enfriamiento de la cuajada (Lawrence *et al.*, 1987; Fox, 1993).

1.2.3. Coagulación

Un paso fundamental en la fabricación de cualquier variedad de queso es la coagulación de la caseína de la leche, con la consiguiente formación de un gel que engloba también a la grasa presente en la misma. Existen dos tipos de coagulación: coagulación láctica o ácida y coagulación enzimática.

La coagulación láctica se realiza por la acción de las bacterias lácticas presentes en la leche cruda o bien añadiendo un cultivo iniciador. De esta forma, la lactosa se transforma en ácido láctico, lo que provoca un descenso en el pH de la leche, produciéndose la desestabilización de las micelas de caseína y la consiguiente precipitación de las mismas o coagulación.

Se sabe que la coagulación enzimática de la leche es un proceso que engloba dos pasos. En el primero (enzimático) la quimosina del cuajo hidroliza la κ -caseína en el enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆. Cuando esto sucede, el C-terminal hidrofóbico del caseinomacropéptido (κ -caseína f106-169) se separa de la κ -caseína (la cual se encuentra localizada en la superficie de las micelas de caseína y es un factor esencial para la estabilidad de la micela), difunde al medio acuoso y se pierde en el suero. A continuación se produce la desestabilización de la hidrofóbica p- κ -caseína restante (κ -caseína f1-105), causando la agregación de las micelas y la coagulación de la leche en presencia de una concentración crítica de Ca²⁺, a temperaturas >20 °C; esta es la segunda fase (no enzimática) del proceso de coagulación (Dalglish, 1993; Fox, 1993).

La coagulación enzimática de la leche (por el cuajo) es la más empleada en la mayoría de las variedades de queso, aunque lo que sucede en realidad es una coagulación mixta, en la que siempre suele existir un predominio más o menos acusado de uno de estos dos modos de coagulación, según la variedad de queso. Esto va a determinar las características de la cuajada obtenida.

Tradicionalmente se ha estado empleando cuajo animal de ternero lactante en la fabricación de la mayoría de las variedades de queso, aunque en algunas variedades de quesos españoles y portugueses se usa como coagulante el extracto de la flor de los cardos *Cynara humilis* y *Cynara cardunculus*. Sin embargo, actualmente la producción del cuajo animal ha sido insuficiente para satisfacer la demanda. Esto ha llevado al uso de numerosos sustitutos del cuajo, entre los cuales se incluyen pepsinas bovina, ovina, porcina y de pollo. Los mohos son fuentes comunes de sustitutos del cuajo; así las proteinasas de *Cryphonectria parasitica*, *Mucor pusillus* y *M. miehei* se están utilizando comercialmente. También se está usando la quimosina recombinante de ternero, expresada en *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* y en *Escherichia coli*, y desde su aceptación por las autoridades reguladoras para su uso en el queso, ha ganado una gran aceptación en muchos, aunque no en todos los países (Fox, 1993; Fox *et al.*, 1994).

Dependiendo del tipo de cuajo empleado van a variar las características sensoriales del producto final, tales como el amargor. Se observó que los extractos de la flor del cardo *Cynara humilis* tienen una actividad proteolítica mucho mayor que otras enzimas coagulantes de la leche (Cabezas, 1980). Núñez *et al.* (1992) encontraron que en el queso Manchego sólo parece afectarse el contenido en nitrógeno soluble y no se ven afectadas las características sensoriales y reológicas al variar el tipo de cuajo, coincidiendo con los resultados obtenidos por Koch *et al.* (1986) en queso Edam y Bines *et al.* (1989) en queso Cheddar.

Grappin *et al.* (1985) observaron cómo estaba influida la actividad de los enzimas coagulantes por el pH y el NaCl. El pH afecta a la actividad proteolítica del cuajo variando el contenido en fracciones nitrogenadas, mientras que el NaCl inhibe la hidrólisis de la β -caseína por la quimosina.

Junto con el cuajo también se suele añadir cloruro cálcico a la leche para mantener el equilibrio entre el calcio soluble en la fase acuosa de la leche con el calcio coloidal ligado a las micelas de caseína, debido a que la refrigeración prolongada de la leche y,

sobre todo, la pasteurización, provocan un aumento del contenido en calcio soluble de la leche a expensas del calcio coloidal, lo cual conlleva una desmineralización de la cuajada.

1.2.4. Corte y desuerado

Una vez que el gel se ha formado, se procede al corte, así las piezas de cuajada formada empiezan a expulsar rápidamente el suero. Este proceso se conoce como sinéresis o desuerado. En muchos casos se realiza un recalentamiento de la cuajada para favorecer la expulsión del suero. El grado y la velocidad de la sinéresis depende de diversos factores, entre ellos, la composición de la leche, especialmente la concentración de Ca^{2+} , la concentración de caseína, el pH del suero, la temperatura de calentamiento de la cuajada, el grado de agitación de la mezcla cuajada-suero y el tiempo.

1.2.5. Salado

Aparte de la contribución directa de la sal al sabor del queso, el grado de adición de sal influye en la maduración del queso y en su calidad a través de los efectos en: 1) el crecimiento y la actividad microbiana, particularmente en el metabolismo de la lactosa residual en la cuajada por las bacterias del *starter* y “*no starter*”, lo cual, de hecho, afecta al pH; (2) la actividad de varios enzimas, incluyendo el coagulante (o cuajo), enzimas endógenas de la leche y enzimas de las bacterias del *starter* y *no starter*; (3) produciendo una mayor sinéresis en la cuajada, lo cual disminuye el contenido en humedad del queso; (4) causando una disminución en la actividad del agua del queso, lo que afecta a la actividad de diversos enzimas durante la maduración (Scott, 1981; Guinee y Fox, 1993).

El salado suele ser el último paso en la fabricación del queso y puede ser realizado de varias formas: por inmersión de la cuajada una vez prensada en una salmuera, que suele tener una concentración del 18-20% en NaCl (por ej., queso Manchego), mediante la aplicación de sal seca en la superficie del queso moldeado (por ej., quesos azules madurados por mohos, Gruyère de Comté, etc.) o bien mezclando sal seca con la cuajada antes del moldeado o prensado (por ej., quesos tipo Cheddar).

1.2.6. Maduración

El coágulo obtenido después del moldeado y salado se denomina queso fresco. Éste puede comercializarse como tal o bien puede ser madurado, desarrollando unas características sensoriales propias de cada variedad de queso.

Durante la maduración del queso se llevan a cabo una serie de cambios físicos, químicos, microbiológicos y enzimáticos que van a conferir al producto final unas características determinadas. La bioquímica de la maduración del queso se trata en el siguiente apartado.

1.3. BIOQUÍMICA DE LA MADURACIÓN DEL QUESO

1.3.1. Metabolismo de los hidratos de carbono (glucolisis)

La glucolisis en el queso consiste en la transformación de la lactosa en ácido láctico por la acción de las bacterias lácticas presentes en la leche cruda o añadidas como cultivo iniciador. El acúmulo de ácido láctico facilita la coagulación de la leche y la retracción de la cuajada, influye en las reacciones enzimáticas y previene el crecimiento de microorganismos perjudiciales o patógenos.

La acidez desarrollada influye a su vez en el aroma de ciertos tipos de quesos, sobre todo en los quesos frescos.

La glucolisis comienza con la coagulación de la leche y el desuerado y prosigue durante la maduración del queso con una intensidad variable, según el tipo de queso.

Así pues, la fermentación láctica juega un papel importante durante el afinado, ya que además de las funciones comentadas anteriormente, no sólo se produce ácido láctico, sino que también se forman otros productos secundarios que son responsables del aroma.

1.3.1.1. Metabolismo de la lactosa por las bacterias lácticas

La ruta del metabolismo de la lactosa durante la fabricación del queso es característica del tipo de bacterias lácticas presentes en el mismo. Las bacterias lácticas se dividen en dos grupos principales de especies según la naturaleza y la concentración de los productos finales resultantes de la fermentación de la glucosa: homofermentativas y heterofermentativas. Las bacterias lácticas homofermentativas, que comprenden las especies de *Streptococcus* (*S. mutans*, *S. thermophilus*), *Enterococcus* (*E. faecalis*), *Lactococcus* (*Lc. lactis* subsp. *lactis*), *Pediococcus* (*P. pentosaceus*, *P. halophilus*) y *Lactobacillus* homofermentativos (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*) convierten prácticamente toda la glucosa en ácido láctico (90-95%). Las bacterias lácticas heterofermentativas fermentan la glucosa produciendo menos de 1,8 moles de ácido láctico/mol de glucosa y

producen, además de ácido láctico, etanol, acetato y CO₂. Los grupos principales que pertenecen a esta clase son los *Leuconostoc* (por ej., *Ln. mesenteroides*) y ciertos *Lactobacillus* (por ej., *Lb. brevis*).

Las principales rutas metabólicas utilizadas por las bacterias lácticas se muestran en la Figura 1.1. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* metaboliza la lactosa a ácido L-láctico. La glucosa sigue la ruta glicolítica mientras que la galactosa es metabolizada por la vía tagatosa. En los quesos elaborados con un *starter* termófilo (p. ej., quesos de tipo suizo) *Streptococcus thermophilus* utiliza la lactosa hidrolizándola por medio de la β -galactosidasa; la glucosa se metaboliza a L-lactato por la ruta glicolítica. *S. thermophilus* es incapaz de metabolizar la galactosa que secreta. Cuando la cuajada se ha enfriado suficientemente pueden crecer especies de *Lactobacillus*. Los lactobacilos galactosa (+) convierten la galactosa por la ruta de Leloir a glucosa-1-fosfato, que después es metabolizada a DL-lactato por la vía glicolítica. Algunas variedades de quesos incluyen como *starter* especies de *Leuconostoc*, los cuales hidrolizan la lactosa por la β -galactosidasa a glucosa y galactosa. La glucosa es metabolizada por la ruta fosfocetolasa a cantidades equimolares de D-lactato, etanol y CO₂, mientras que la galactosa es probablemente metabolizada por la ruta de Leloir a glucosa-1-fosfato.

El ácido láctico producido contribuye probablemente al sabor y al aroma de los quesos, especialmente los de coagulación ácida y los quesos frescos de coagulación enzimática. El etanol también puede contribuir directamente al sabor y al aroma del queso o puede participar en la formación de ésteres con ácidos grasos (Fox *et al.*, 1990; Cogan y Hill, 1993).

La mayor parte de la lactosa de la leche se pierde en el desuerado del queso en forma de lactosa o ácido láctico (Huffman y Kristoffersen, 1984). Sin embargo, la cuajada al final de la fabricación aún contiene entre un 0,8-1,5% de lactosa (dependiendo de la variedad); esta lactosa residual es metabolizada generalmente por las bacterias del *starter*. La velocidad a la cual es metabolizada la lactosa depende en gran medida del contenido en sal en peso húmedo de la cuajada (Turner y Thomas, 1980).

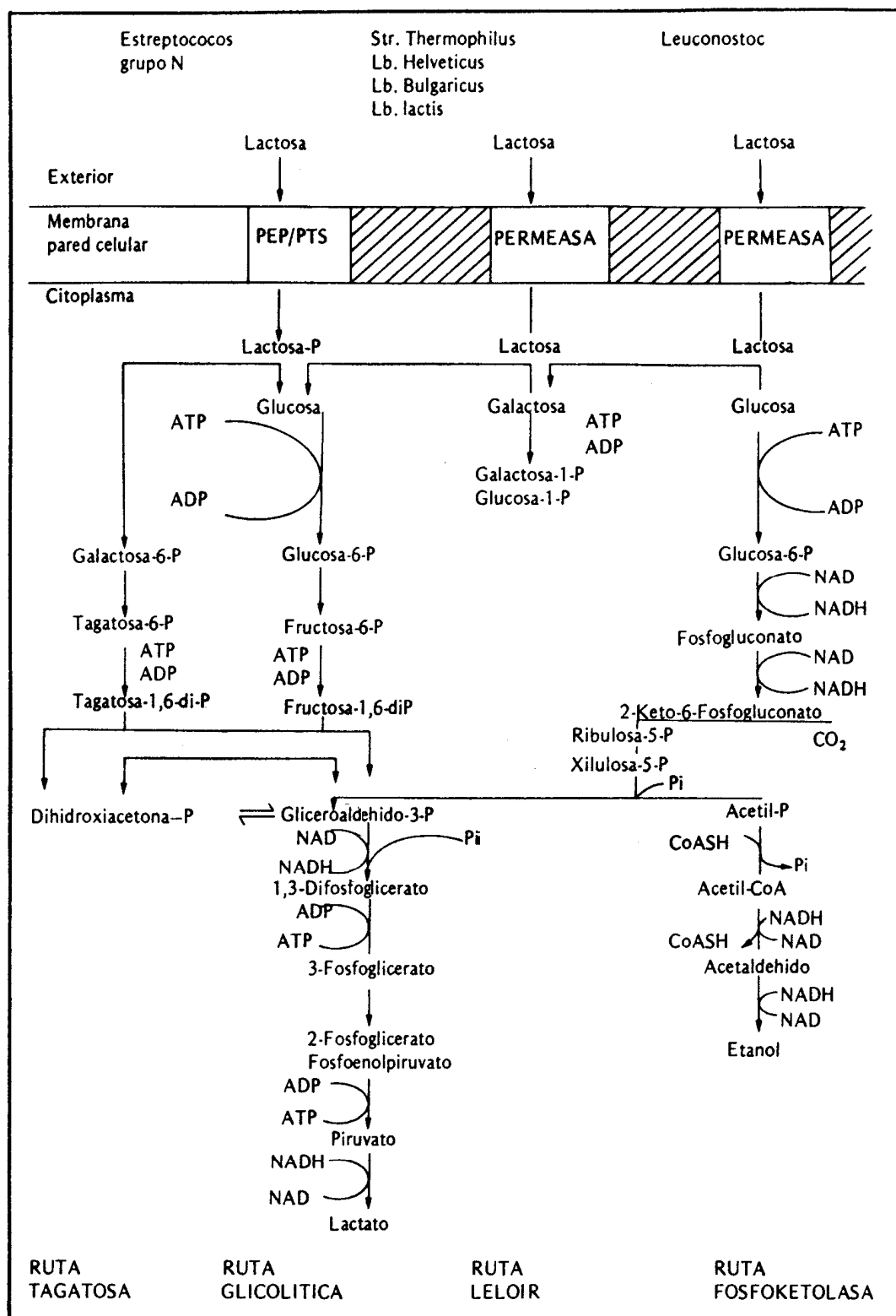


Figura 1.1: Rutas metabólicas utilizadas por las bacterias lácticas (Tomada de Cogan y Daly, 1987)

1.3.1.2. Metabolismo del lactato por las bacterias lácticas

El nivel de lactato inmediatamente después de la fabricación en queso Cheddar, Suizo y Camembert está en torno a 0,9, 1,2 y 1,0%, respectivamente (Turner y Thomas, 1980; Turner *et al.*, 1983; Karahadian y Lindsay, 1987). El destino de la lactosa en el queso depende de la variedad. En queso Cheddar, quesos holandeses y variedades similares, las NSLAB isomerizan el L-lactato a DL-lactato (Thomas y Crow, 1983). La isomerización del L-lactato no es significativa desde el punto de vista del sabor y aroma, pero el D-lactato cálcico, que es menos soluble que el L-lactato cálcico, puede cristalizar en el queso y formar pequeños cristales blancos indeseables, especialmente en las superficies de corte (Dybing *et al.*, 1988). El lactato puede ser metabolizado posteriormente en el queso Cheddar y en quesos de tipo holandeses; ciertas cepas de NSLAB incluídas *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus plantarum*, oxidan el lactato a acetato, CO₂ y H₂O.

En quesos de tipo suizo, las bacterias del *starter* metabolizan completamente los azúcares fermentables en aproximadamente, dos semanas. El cultivo iniciador secundario (bacterias propiónicas) crece rápidamente cuando se transfiere a una cámara templada (22 °C) y metaboliza el lactato a propionato, acetato y CO₂. El CO₂ generado es el responsable de la formación de ojos, lo cual es característico de los quesos de tipo suizo, mientras que el acetato y, particularmente, el propionato contribuyen al aroma y al sabor del queso (Turner *et al.*, 1983).

El metabolismo del lactato se da de forma muy intensa en quesos madurados por mohos, como en el queso Camembert y en el Brie (Karahadian y Lindsay, 1987; Fox *et al.*, 1990). Después de la fabricación, los mohos de la superficie (*Geotrichum candidum* y *Penicillium caseicolum*) colonizan y dominan rápidamente la superficie de estos quesos, metabolizando rápidamente el lactato a CO₂ y H₂O, y provocando un incremento en el pH y la formación de un gradiente de pH desde la superficie al centro; esto causa la difusión del lactato hacia el exterior. Cuando todo el lactato ha sido metabolizado, los mohos metabolizan las proteínas, resultando en la formación de NH₃ que difunde al interior, produciendo un mayor aumento del pH. El metabolismo del lactato y de las proteínas y el

resultante aumento del pH influyen en la solubilidad del fosfato cálcico (lo que afecta a la textura) y a la actividad de la plasmina (que afecta a la proteólisis) durante la maduración de estas variedades de quesos (Fox *et al.*, 1990).

1.3.1.3. Metabolismo del citrato

La leche contiene aproximadamente 8 mM de citrato, la mayor parte del cual (~90%) es soluble y se pierde en el suero durante la fabricación del queso. *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis* y especies de *Leuconostoc* metabolizan el citrato a compuestos como el diacetilo y el CO₂ (Cogan, 1987; Cogan y Daly, 1987) (Figura 1.2). El diacetilo contribuye al aroma y al sabor de los quesos y de muchos tipos de leches fermentadas. Debido a la producción de CO₂, el metabolismo del citrato es el responsable de la formación de los ojos característicos en los quesos tipo holandeses y de la textura abierta indeseable y los defectos de flotación de la cuajada en queso Cheddar y Cottage, respectivamente (Fox *et al.*, 1990).

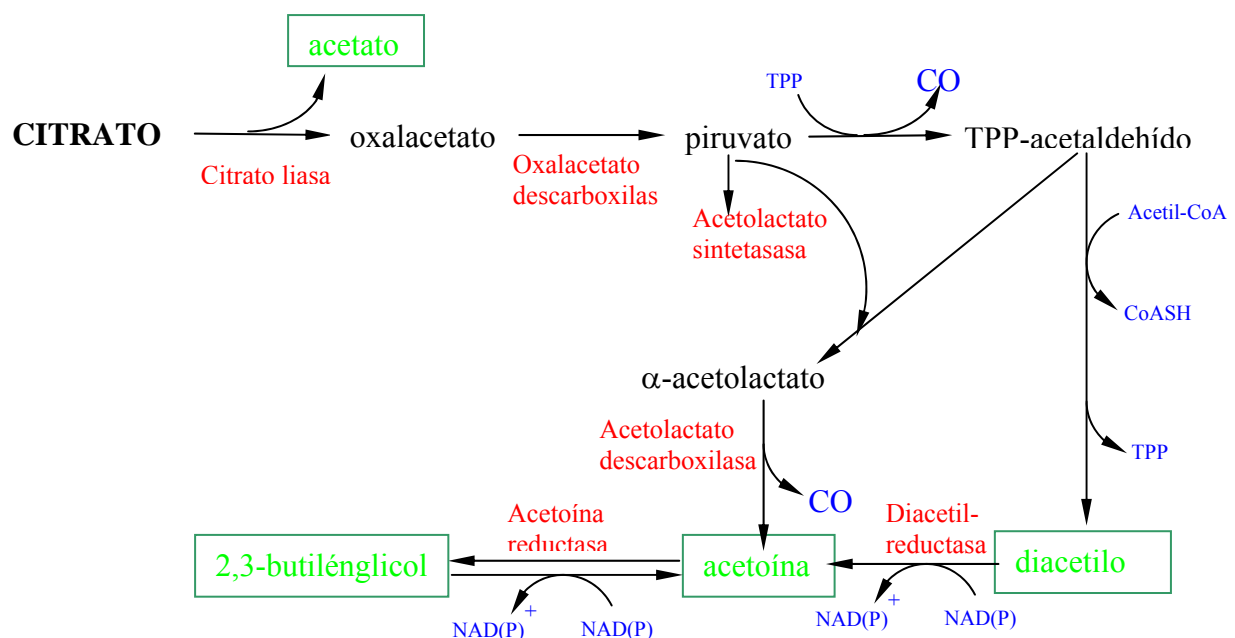


Figura 1.2: Ruta del metabolismo del citrato en *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* y en *Leuconostoc* (de Fox *et al.*, 1990)

1.3.2. Lipolisis

La grasa es esencial para el desarrollo de un aroma propio en el queso durante la maduración. Los quesos que se elaboran normalmente con leche entera no desarrollan un sabor apropiado cuando se elaboran con leche desnatada o leche en la cual la grasa ha sido sustituida por otros constituyentes (Ohren y Tuckey, 1967; Foda *et al.*, 1974; Wijensudera *et al.*, 1998). De hecho, el principal problema en la elaboración de quesos bajos en grasa es la consecución de un buen sabor, propio del queso.

Como en todos los alimentos que tienen un elevado contenido en grasa, la grasa del queso puede experimentar degradaciones via lipolisis (enzimática) u oxidación (química), si bien, el grado de oxidación en los quesos es limitado debido probablemente a su bajo potencial redox y a la presencia en el queso de antioxidantes naturales (Adda *et al.*, 1982). La lipolisis consiste en la hidrólisis de los triglicéridos en glicéridos parciales y ácidos grasos libres (AGL). Los ácidos grasos liberados contribuyen directamente al sabor y al aroma del queso, especialmente en quesos duros italianos y en variedades maduradas por mohos. Los ácidos grasos libres contribuyen en menor medida al sabor del queso Cheddar joven y al de los quesos holandeses; sin embargo, en quesos extramaduros, como el Parmesano, los ácidos grasos libres contribuyen al sabor en la medida en que son equilibrados por productos de la proteolisis y otras reacciones (Fox *et al.*, 1995b).

1.3.2.1. Agentes lipolíticos

Las lipasas y esterases en el queso provienen de la leche, del cuajo, del *starter*, del *starter* secundario o de las bacterias no *starter*, siendo las enzimas microbianas la principal fuente. La actuación de las distintas enzimas depende de la variedad de queso.

La leche contiene una lipoprotein-lipasa (LPL) nativa bien caracterizada (Olivecrona y Bengtsson-Olivecrona, 1991) y varias esterases (Deeth y Fitzgerald, 1976). La LPL bovina es poco específica y libera ácidos grasos de las posiciones sn-1 y sn-3 de los mono, di y triglicéridos y de la posición sn-1 de los glicerofosfolípidos (Olivecrona *et al.*, 1992). En la grasa de la leche los ácidos grasos de cadena corta (responsables del

sabor y del olor) están esterificados principalmente en la posición sn-3 (Parodi, 1979) y por tanto, incluso una baja actividad de la LPL puede tener un efecto significativo en el sabor y al aroma del queso. La LPL está asociada fundamentalmente a las micelas de caseína y, por tanto, pasa al queso. La LPL es la responsable probablemente de una lipólisis considerable en los quesos que se elaboran con leche cruda y también puede contribuir a la lipólisis en los quesos de leche pasteurizada, ya que se requiere un calentamiento a temperaturas por encima de 78 °C durante 10 segundos para su completa inactivación (Driessen, 1989). Las bacterias psicrótrofas (por ej., especies del género *Pseudomonas*) que dominan la microbiota de la leche refrigerada son una fuente potencialmente importante de lipasas en el queso si su concentración supera recuentos de 10^7 ufc/mL (Cousins *et al.*, 1977). Aunque los microorganismos psicrótrofos se destruyen durante la pasteurización, sus lipasas son termorresistentes y pueden tener actividad lipolítica durante la maduración. A diferencia de las proteinasas de las bacterias psicrótrofas, las cuales son solubles en agua y se pierden en el suero, las lipasas de las mismas son adsorbidas en la superficie del glóbulo graso y se concentran en la cuajada durante la fabricación (Fox, 1989). Las lipasas de las bacterias psicrótrofas pueden causar enranciamiento en el queso después de un largo período de maduración (Sorhaug y Stepaniak, 1977).

En la elaboración de variedades de quesos duros italianos, como el Romano y el Provolone, se utilizan pastas de cuajo sin purificar. Estas pastas contienen una potente lipasa, llamada esterasa pregástrica (EPG), la cual cataliza la intensa lipólisis que es responsable del sabor picante característico de estos quesos (Fox y Stepaniak, 1993). La EPG presenta generalmente una gran especificidad sobre los ácidos grasos de cadena corta (especialmente el ácido butírico) esterificados en la posición sn-3. Las EPG del cuajo de ternera, cabrito y cordero poseen generalmente características similares, sin embargo, muestran sutiles diferencias en cuanto a especificidad, lo cual facilita la elaboración de quesos italianos con diferentes perfiles de sabor y de aroma. También se han ensayado lipasas de origen fúngico que parecen dar resultados satisfactorios en la elaboración de quesos (Fox y Stepaniak, 1993).

Generalmente, casi todos los microorganismos relacionados con la elaboración de queso muestran alguna actividad lipolítica-esterolítica. Normalmente, la actividad de las bacterias lácticas y propiónicas parece ser limitada pero los lactococos y leuconostoc podrían ser más activos que los lactobacilos y que *Streptococcus thermophilus* (Gripon *et al.*, 1991).

Por otro lado, la flora contaminante de muchas variedades de quesos incluye especies de *Micrococcus* y *Pediococcus*, las cuales han mostrado tener actividad lipolítica y esterolítica y podrían por tanto, contribuir a la lipólisis durante la maduración del queso (Bhowmik y Marth, 1990).

En muchas variedades de quesos, la microbiota secundaria posee actividad lipolítica-esterolítica. Sin embargo, los mohos son los agentes lipolíticos de mayor actividad. En variedades de quesos maduradas por mohos, la lipólisis es debida fundamentalmente, a las lipasas de *Penicillium roqueforti* o *P. camemberti*. *P. camemberti* produce una lipasa extracelular con un pH óptimo alcalino mientras que se ha encontrado que *P. roqueforti* produce tres lipasas, una con un pH óptimo alcalino y dos con un pH óptimo ácido (Gripon, 1993).

1.3.2.2. Catabolismo de los ácidos grasos

En la mayoría de las variedades de queso, la lipólisis no es muy intensa. Generalmente no supera el 2% de los triglicéridos en los quesos Gouda, Gruyère, Cheddar o Manchego. Sin embargo, en los quesos madurados por mohos en la superficie, el grado de lipólisis puede alcanzar hasta un 10% de los triglicéridos, y en quesos azules pueden estar presentes en forma libre hasta el 25% de los ácidos grasos totales. También se han encontrado concentraciones relativamente altas de AGL en quesos duros italianos, como el Parmesano y el Romano.

Los AGL liberados pueden participar en varias reacciones químicas (Figura 1.3). La importancia de éstas depende de la variedad de queso. La degradación oxidativa de los AGL es la responsable de la formación de C_(n-1) metilcetonas y de los correspondientes

alcoholes secundarios de C_n ácidos grasos (principalmente desde el $C_{6:0}$ hasta el $C_{12:0}$). Estos compuestos son altamente responsables del aroma característico de los quesos azules y del queso Camembert (Gripon *et al.*, 1991). Los AGL son primeramente oxidados a β -cetoácidos, los cuales son después descarboxilados a las correspondientes metilcetonas con un átomo de carbono menos. Las metilcetonas también pueden formarse por la acción de los mohos a partir de los cetoácidos presentes de forma natural a bajas concentraciones en la grasa láctea o por la oxidación de ácidos grasos monoinsaturados (Kinsella y Hwang, 1977). En quesos en los que no se da el crecimiento de mohos durante la maduración, las metilcetonas se forman por medio de los cetoácidos presentes en la leche (Adda *et al.*, 1982). Las metilcetonas se pueden reducir a alcoholes secundarios (2-pentanol, 2-heptanol), los cuales contribuyen al sabor de los quesos madurados por mohos.

Los ésteres también juegan un papel importante en la formación del sabor en el queso. La síntesis de los ésteres se da normalmente a partir de ácidos grasos de cadena corta o media, así como de alcoholes alifáticos (etanol), aromáticos (alcohol fenilético) o tioles (metanotiol). Los ésteres también pueden proceder de reacciones puramente químicas, especialmente en quesos madurados durante largos períodos de tiempo (Adda *et al.*, 1982).

Las lactonas son ésteres cíclicos que se originan como resultado de la esterificación intramolecular de un hidroxiácido para formar una estructura cíclica con la pérdida de agua. Las lactonas poseen fuertes aromas, que aunque no son aromas “lácteos”, pueden contribuir al sabor global del queso (Fox, 1993). Se sabe que las lactonas γ - C_{12} , γ - C_{14} , γ - C_{16} , δ - C_{10} , δ - C_{12} y δ - C_{14} , δ - C_{15} , δ - C_{16} están correlacionadas con el tiempo de maduración y con la intensidad del sabor en el queso Cheddar (Fox *et al.*, 2000).

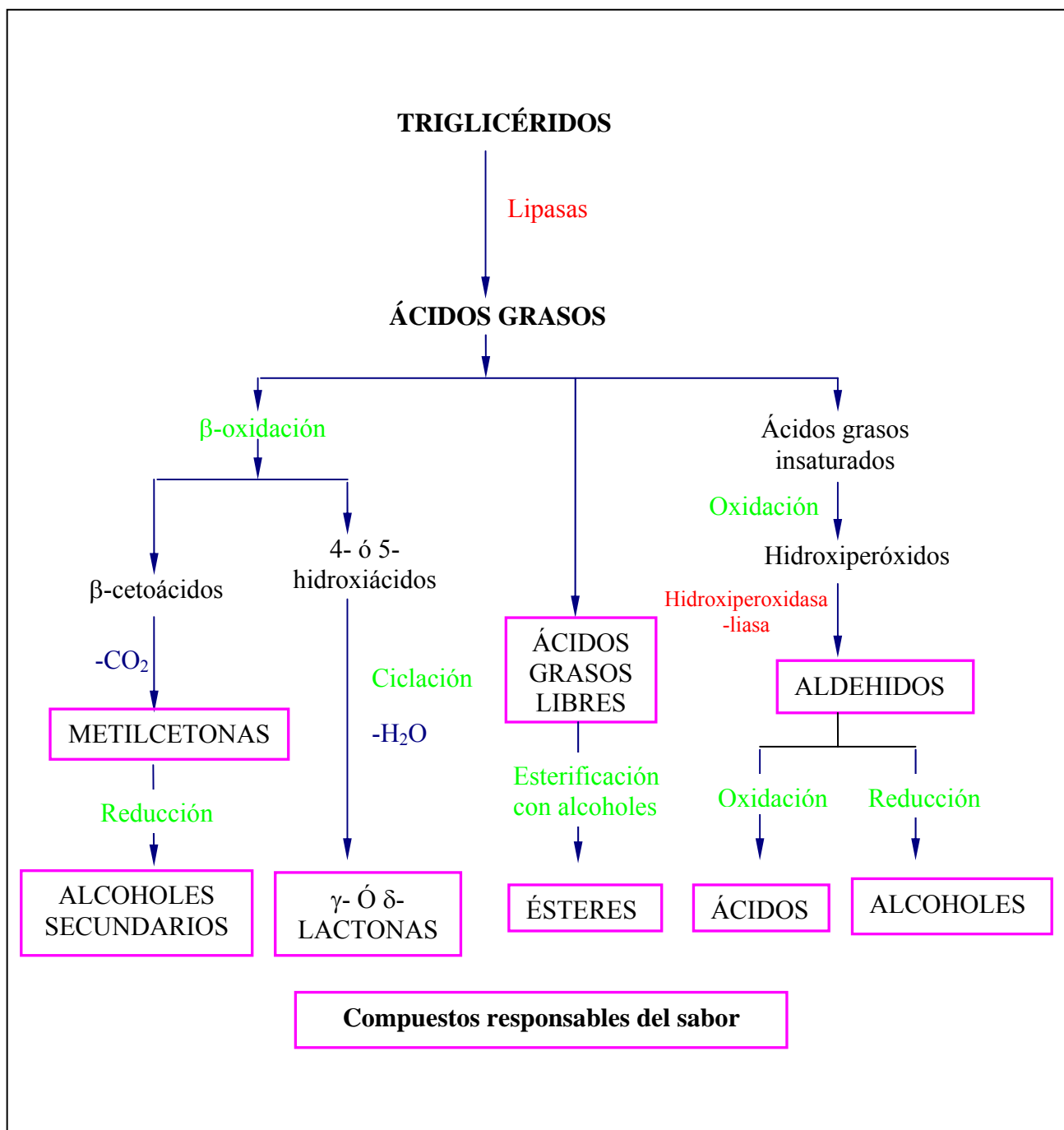


Figura 1.3: Rutas generales del catabolismo de los ácidos grasos en el queso

1.3.2.3. Técnicas de análisis para el estudio de la lipólisis

El estudio de la lipólisis experimentada por el queso o por los productos lácteos en general, se realiza por medio de la determinación del contenido en ácidos grasos libres. Los métodos globales de determinación de los AGL solamente permiten estimar el grado de lipólisis, pero para establecer la clasificación de la muestra sobre la base de la percepción organoléptica, es necesario estimar las cantidades de los AGL individuales (De la Fuente y Juárez, 1993). Para ello es necesario, en un primer paso, el aislamiento de los AGL antes de proceder a su análisis. Estos métodos de aislamiento pueden estar basados en una separación mecánica (BDI, 1985), en la extracción con disolventes (Worsstoff *et al.*, 1972; Pillay *et al.*, 1980), en la adsorción en fase sólida (Harper *et al.*, 1956), y en la extracción con fluidos supercríticos (Tuomala y Kallio, 1996).

En la bibliografía revisada se han encontrado diversos métodos para la determinación del perfil de AGL en queso, siendo la cromatografía de gases la técnica instrumental más empleada para su análisis y cuantificación (Gray, 1975; Woo y Lindsay, 1982; Contarini *et al.*, 1989; McNeill y Connolly, 1989; De Jong y Badings, 1990; Juárez *et al.*, 1992). Algunos autores han utilizado la inyección directa de los ácidos grasos sin derivatizar, pero esto presenta problemas de adsorción de los ácidos en los puntos activos de la columna, provocando malas separaciones. Por ello, lo más frecuente es proceder a la derivatización de los ácidos grasos previamente a su inyección en el equipo cromatográfico. Tuomala y Kallio (1996) aplicaron la extracción de CO₂ supercrítico junto a la cromatografía de gases para el aislamiento e identificación de ácidos grasos y otros compuestos volátiles en queso suizo.

Recientemente también se ha utilizado la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para realizar el análisis de los AGL. García *et al.* (1990) propusieron un método para la determinación de los AGL en grasa láctea utilizando un equipo de HPLC con una fase móvil de tres componentes. Esta técnica ha sido utilizada por diversos autores para la cuantificación de AGL en el queso (Macedo y Malcata, 1996; Sousa y Malcata, 1997).

De todos los métodos, el propuesto por Metcalfe y Wang (1981), modificado posteriormente por Juárez *et al.* (1992) permite la separación en un solo paso de la fracción de los AGL y la de los combinados en los triglicéridos, y ha dado buenos resultados en la leche y en el queso (Martínez-Castro *et al.*, 1986; Martín-Hernández *et al.*, 1988; Juárez *et al.*, 1992; De la Fuente *et al.*, 1993). Por ello, se eligió este método para el análisis de los AGL en el queso Manchego (Capítulo 3 de esta Memoria).

1.3.3. Proteolisis

1.3.3.1. Agentes proteolíticos

La proteolisis es el fenómeno bioquímico más complejo y, posiblemente más importante que tiene lugar durante la maduración de la mayoría de las variedades de queso. Los agentes proteolíticos son enzimas procedentes de: 1) el cuajo o coagulante utilizado (fundamentalmente quimosina, también puede ser pepsina o proteinasas fúngicas ácidas; 2) la leche (generalmente plasmina y quizás catepsina D y otras proteinasas de células somáticas) 3) las bacterias del *starter* 4) la flora ocasional no *starter* 5) el *starter* secundario (en algunas variedades de queso), como *P. roqueforti*, *P. camemberti*, *Br. linens*, especies de lactobacilos y 6) proteinasas exógenas añadidas para acelerar la maduración o acentuar el sabor.

La contribución relativa de los enzimas proteolíticos de estas fuentes depende de la variedad de queso, y ha sido estudiada en quesos elaborados en condiciones microbiológicas controladas (Fox, 1993).

La proteolisis que tiene lugar durante la maduración del queso podría ser resumida como una hidrólisis inicial de las caseínas catalizada, en primer lugar, por el cuajo residual y en menor grado, por la plasmina, resultando en la formación de péptidos de peso molecular alto y medio, los cuales son sucesivamente degradados por el cuajo y los enzimas del *starter* y de la microbiota no *starter* presente en el queso. La producción de pequeños péptidos y aminoácidos libres es debida a la acción de las proteinasas y peptidasas bacterianas. Así, durante la proteolisis las caseínas son hidrolizadas a péptidos y aminoácidos libres, los cuales participan directamente en el aroma y en el sabor del queso o sirven de precursores para el desarrollo del sabor (Fox, 1989).

La extensión de la proteólisis en el queso puede ser desde muy limitada (en quesos como el Mozzarella) hasta muy extensa (quesos azules). Los productos de la proteólisis van desde grandes polipéptidos, de tamaño comparable a caseínas intactas, pasando por un rango de péptidos de tamaño pequeño y medio hasta aminoácidos libres (Fox *et al.*, 1995a). La proteólisis es la principal responsable de:

-cambios en la textura debidos a: a) la hidrólisis de la matriz proteica, b) disminución en la actividad del agua causada por la unión de moléculas de agua con grupos carboxilo y amino liberados, c) aumento del pH debido a la producción de NH_3 por la desaminación de aminoácidos libres.

-contribución directa al aroma y al sabor mediante la formación de péptidos y aminoácidos y en algunos casos, también es la causante de sabores indeseables (especialmente amargor, que está producido por la formación de péptidos hidrófobos).

-liberación de sustratos, principalmente aminoácidos libres, para otras reacciones generadoras de compuestos del sabor (p. ej., desaminación, descarboxilación, desulfuración).

-liberación durante la masticación de compuestos sápidos del queso (Fox y McSweeney, 1996).

Los coagulantes empleados para la leche consisten en preparaciones de proteinasas seleccionadas que poseen generalmente una actividad proteolítica considerable. La quimosina es la proteinasa que se encuentra en mayor proporción en los cuajos animales tradicionales, siendo el resto pepsina. El papel principal de la quimosina en la fabricación de queso es la hidrólisis específica del enlace $\text{Phe}_{105}\text{-Met}_{106}$ de la proteína estabilizadora de la caseína, la κ -caseína, durante la coagulación de la leche. La mayor parte del cuajo añadido a la leche se pierde en el suero, pero aproximadamente un 6% queda retenido en la cuajada, dependiendo del tipo de coagulante, temperatura de cocción y pH en el momento del desuerado. El cuajo residual contribuye a la proteólisis en muchas variedades de queso (Creamer *et al.*, 1985). En quesos de pasta cocida, como el

Emmental, la quimosina es desnaturalizada en su mayor parte y apenas contribuye a la maduración.

La plasmina es la principal proteinasa nativa de la leche, y ha sido objeto de diversos estudios y revisiones bibliográficas (Grufferty y Fox, 1988; Bastian y Brown, 1996). El sistema proteolítico de la plasmina es complejo y consiste en el enzima activo (plasmina), su zimógeno (plasminógeno), activadores e inhibidores de la plasmina y de los activadores del plasminógeno (Figura 1.4), los cuales están todos presentes en la leche. La plasmina, el plasminógeno y los activadores del plasminógeno están asociados a las micelas de caseína de la leche, mientras que los inhibidores de la plasmina se encuentran en la fase del suero. La plasmina es una proteinasa tripsín-serina con una actividad óptima a pH 7,5 y 37 °C y es altamente específica para enlaces peptídicos en el extremo C-terminal de residuos lisil y, en menor grado, arginil (Weinstein y Doolittle, 1972). Es especialmente activa sobre las α_{s2} - y β -caseínas; la hidrólisis de la última conlleva a la formación de las γ -caseínas (fragmentos C-terminales) y proteosomas-peptonas (fragmentos N-terminales) (Farkye y Fox, 1992). La leche también contiene una proteinasa ácida, conocida ahora como catepsina D, la cual es relativamente sensible al calor (se inactiva a 70 °C/10 min.) y tiene un pH óptimo de 4,0 (Kaminogawa *et al.*, 1980). La especificidad de la catepsina D es similar a la de la quimosina, con preferencia por la α_{s1} -cn, pero esta enzima presenta una escasa actividad coagulante de la leche (McSweeney *et al.*, 1995). En quesos elaborados sin cuajo, la formación del péptido α_{s1} cn f24-199 se ha atribuido a la proteasa ácida de la leche (Visser y Groot-Mostert, 1977). Aparte de la catepsina D, también existen otras proteasas ácidas en la leche, como la elastasa, la cual es capaz de degradar la α_{s1} - y la β -cn en 6 horas de incubación produciendo un amplio rango de péptidos detectables por electroforesis en gel de urea-poliacrilamida y posee una amplia especificidad sobre la β -cn (Considine *et al.*, 1998).

Los enzimas microbianos son agentes proteolíticos importantes en todos los tipos de quesos. Las bacterias lácticas poseen un sistema proteinasa-peptidasa que ha sido extensamente estudiado y revisado (Fox y McSweeney, 1996; Kungi *et al.*, 1996). Las bacterias lácticas poseen una proteinasa asociada a la pared celular (PrpP), varias

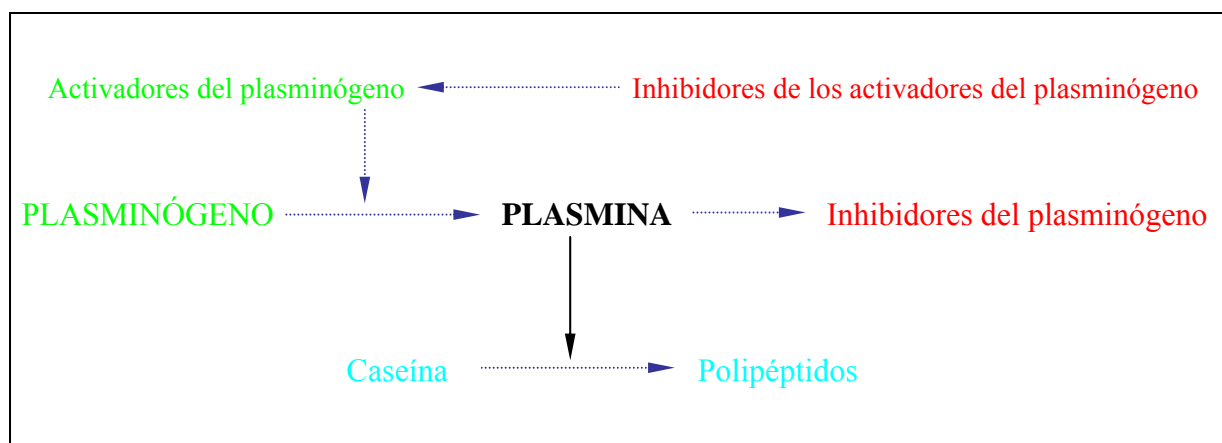


Figura 1.4: El sistema plasmina en la leche.

oligoendopeptidasas (PepO y PepF), al menos dos aminopeptidasas genéricas (PepN y PepC), una glutamil-aminopeptidasa (PepA), una prolil-dipeptidasa aminopeptidasa (PepX), una prolidasa (PepQ), una tripeptidasa genérica (PepT), y una dipeptidasa genérica (PepV); también poseen sistemas para el transporte de péptidos y aminoácidos. Este sistema proteolítico es necesario para que se produzca el crecimiento de las bacterias lácticas hasta un número elevado en la leche (10^9 - 10^{10} ufc mL^{-1}), que sólo contiene bajos niveles de péptidos pequeños y aminoácidos. La PrtP contribuye a la formación de péptidos pequeños en el queso, posiblemente por la hidrólisis de grandes péptidos que provienen de la α_{s1} -cn por la quimosina o de la β -cn por la plasmina, mientras que las aminopeptidasas, dipeptidasas y tripeptidasas, que son intracelulares, son liberadas tras la lisis celular y son las responsables de la producción de aminoácidos libres.

Las bacterias lácticas no *starters* (NSLAB), aunque inicialmente están presentes en bajos recuentos, crecen rápidamente hasta alcanzar alrededor de 10^7 ufc g^{-1} en 4 semanas y permanecen más o menos constantes a lo largo de la maduración (Folkertsma *et al.*, 1996). Así, dependiendo de la velocidad de la lisis del *starter*, las NSLAB pueden predominar en algunas variedades de queso durante la maduración (Fox y McSweeney, 1996). Las

NSLAB son especialmente importantes en quesos de leche cruda. La actividad de las NSLAB parece complementar la acción proteolítica del *starter*, produciendo péptidos de peso molecular generalmente similar y aminoácidos libres (Lynch *et al.*, 1997).

En muchas variedades de quesos se añade intencionadamente una flora secundaria, que junto con la acción de condiciones medioambientales determinadas, ejercen una serie de funciones, dependiendo en cada caso de los microorganismos utilizados. El sistema proteolítico de los *starters* secundarios tradicionales, como *P. roqueforti* (quesos azules), *P. camemberti* (quesos Camembert y Brie), *Propionibacterium spp.* (quesos suizos) y *Br. linens* (quesos de flora superficial) ha sido revisada por Fox y McSweeney (1996). Ambas especies producen aspartil proteinasas y metaloproteinazas; *P. camemberti* posee además una proteinasa ácida intracelular, mientras que *P. roqueforti* produce una carboxipeptidasa de amplia especificidad, amino- y carboxipeptidasas (Paquet y Gripon, 1980) y una metalo-aminopeptidasa extracelular (Gripon *et al.*, 1991).

1.3.3.2. Catabolismo de los aminoácidos

Los productos finales de la proteólisis son los aminoácidos libres. El catabolismo de los aminoácidos resultantes puede dar lugar a la formación de un diverso número de compuestos, como amoníaco, aldehídos, fenoles, indol y alcoholes, los cuales pueden contribuir de forma importante al desarrollo del sabor en el queso. El primer paso en el catabolismo de los aminoácidos conlleva reacciones de descarboxilación, desaminación, transaminación, desulfuración o quizás hidrólisis de la cadena lateral del aminoácido. En un segundo paso se da la conversión de los compuestos resultantes (aminas y α -cetoácidos, así como de los aminoácidos mismos) a aldehídos, fundamentalmente por la acción de las desaminasas sobre las aminas. La parte final del catabolismo de los aminoácidos es la reducción de los aldehídos a alcoholes, o su oxidación a ácidos. Los aminoácidos azufrados pueden experimentar una extensa conversión, conduciendo a la formación de un número de compuestos, como metanotiol y otros compuestos azufrados. Las rutas del catabolismo de los aminoácidos libres han sido revisadas por Hemme *et al.*, (1982), Fox *et al.*, (1995a) y Fox y Wallace, (1997), y se resumen en la Figura 1.5. A

pesar de la importancia de estas rutas, aún no se conocen con detalle los mecanismos de estas reacciones y los agentes que las producen.

La concentración de aminoácidos libres depende de la variedad de queso y han sido utilizados como índices de la maduración (Aston *et al.*, 1983; Puchades *et al.*, 1989; McSweeney y Fox, 1997a). La concentración de aminoácidos libres en el queso en cualquier momento de la maduración es el resultado neto de la liberación de aminoácidos a partir de las caseínas y de su transformación en productos catabólicos. La concentración de los aminoácidos aumenta generalmente con la maduración, a excepción de la arginina, que se ha visto que disminuye en estados de maduración avanzados (Puchades *et al.*, 1989). La composición de la fracción aminoacídica del queso y las proporciones relativas de aminoácidos individuales se han considerado como un factor importante para el desarrollo del sabor típico del queso (Broome *et al.*, 1990). Sin embargo, la proporción relativa de aminoácidos individuales respecto al total de aminoácidos parece ser similar en muchas variedades. Además, McGarry *et al.* (1994) y Christensen *et al.* (1995), comprobaron que al aumentar la concentración de aminoácidos libres en el queso o el uso de cepas de lactococos modificados genéticamente para producir grandes cantidades de PepN no aceleraron la maduración o la intensidad del sabor. Fox y Wallace, (1997) sugirieron que el sabor y la concentración de aminoácidos libres podría no estar correlacionada, ya que diferentes tipos de quesos (como Cheddar, Gouda y Edam) que poseen sabores muy diferentes, presentaron concentraciones y proporciones relativas de aminoácidos libres muy similares. Estos resultados mostraron que la producción de aminoácidos no es el paso limitante en la maduración del queso, aunque se piensa que quizás pueda serlo la modificación química o enzimática de los aminoácidos.

1.3.3.3. Técnicas para la evaluación de la proteólisis en el queso

Los métodos para el seguimiento de la proteólisis durante la maduración del queso pueden dividirse en técnicas no específicas y específicas. Las técnicas no específicas incluyen la cuantificación del nitrógeno soluble en diversos extractantes o precipitantes y la liberación de grupos reactivos. Las caseínas son insolubles en muchos solventes, pero los péptidos producidos a partir de las mismas pueden ser solubles y así, la proporción de

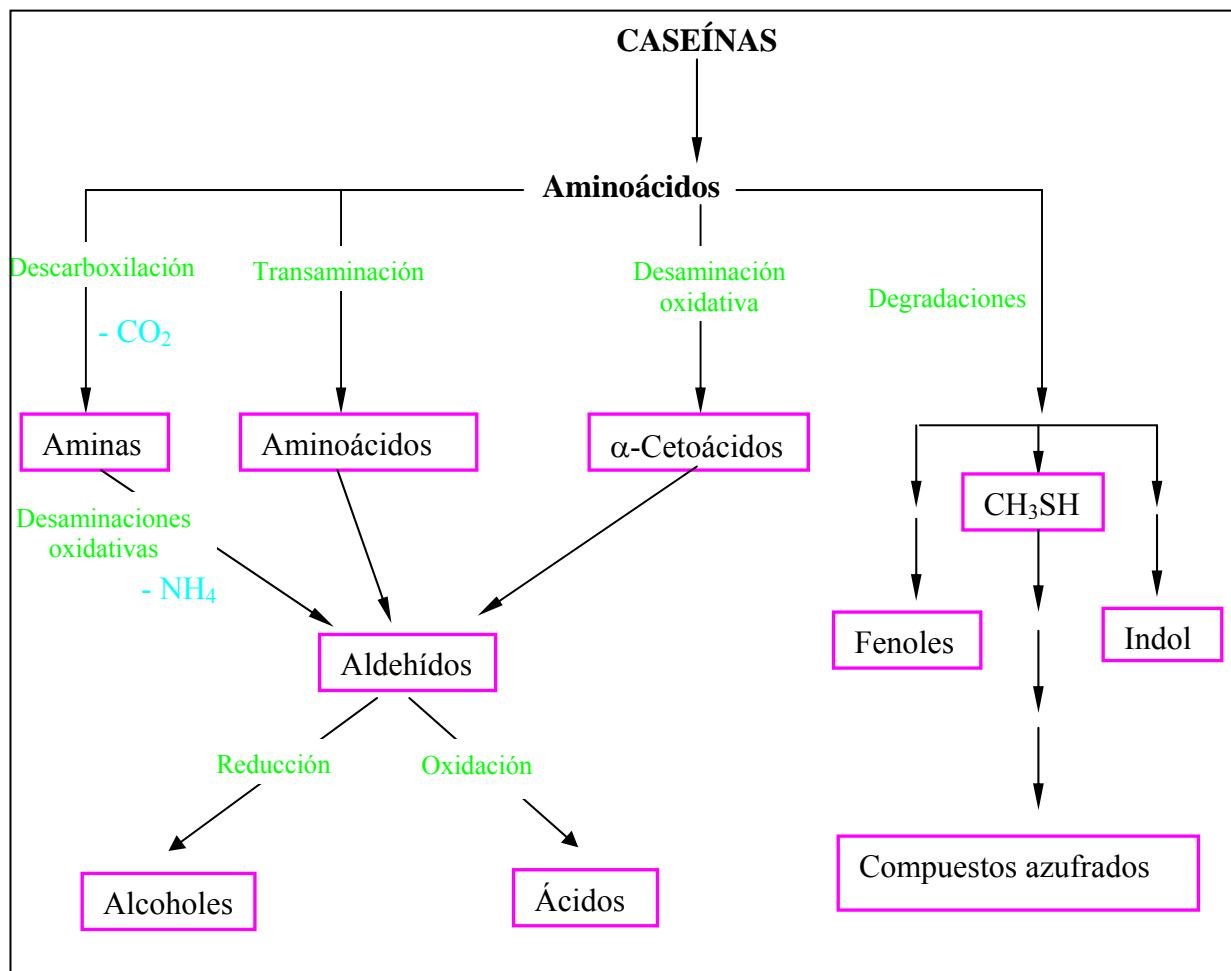


Figura 1.5: Rutas generales del catabolismo de los aminoácidos

nitrógeno soluble va aumentando con la proteólisis. Los métodos no específicos son especialmente útiles para evaluar la extensión de la proteólisis en el queso, ya que los péptidos de pesos moleculares diferentes pueden ser precipitados con una cuidadosa elección del solvente; así, por ej., el extracto soluble en agua del queso Cheddar contiene numerosos péptidos de tamaño intermedio y pequeño y aminoácidos libres (McSweeney y Fox, 1997a), mientras que la fracción soluble en ácido fosfotúngstico 5% contiene sólo aminoácidos libres (excepto Lys y Arg) y péptidos de tamaño inferior a 600 Da (Jarret *et al.*, 1982).

Aunque algunas técnicas no específicas ofrecen una información útil sobre el grado de proteólisis y de la actividad de los agentes proteolíticos, lo cierto es que dan poca

información sobre los péptidos que se acumulan o se degradan durante la maduración del queso. Las técnicas específicas se emplean para separar péptidos individuales o aminoácidos libres utilizando, principalmente, la cromatografía o la electroforesis (McSweeney y Fox, 1997b). En los casos en que se requiere un estudio detallado de la proteólisis, se debe usar una combinación de técnicas específicas y no específicas siguiendo un esquema de fraccionamiento del nitrógeno del queso, como los descritos por O'Sullivan y Fox (1990), Cliffe *et al.* (1993), Singh *et al.* (1994) y Breen *et al.* (1995).

-Métodos de extracción y fraccionamiento del nitrógeno en el queso

La forma más sencilla y más utilizada de preparar una fracción nitrogenada soluble es probablemente la homogeneización del queso en agua. El problema reside en que se debería proceder a la estandarización de los diferentes procedimientos para obtener resultados comparables. Kuchroo y Fox (1982a) compararon varias técnicas de extracción del N soluble para queso Cheddar. Todas las técnicas de homogeneización estudiadas excepto una, dieron resultados muy similares. Estos autores propusieron un esquema de fraccionamiento del nitrógeno soluble que se muestra a continuación:

1. Rallar la muestra de queso
2. Pesar 20 g (u otra cantidad adecuada) en una bolsa de Stomacher; añadir el doble del peso de la muestra de agua
3. Homogeneizar en Stomacher a ~ 20°C durante 10 min.
4. Calentar hasta 40 °C y mantener durante 30 min.
5. Centrifugar a 3000 x g durante 30 min.
6. Filtrar el sobrenadante a través de lana de vidrio

Mediante este procedimiento se extrae ~ el 70% del nitrógeno soluble en agua; si se requiere una extracción más completa, se han de repetir los pasos del 2 al 6.

El extracto de queso soluble en agua contiene numerosos péptidos de pequeño y medio tamaño, aminoácidos libres y sus productos de degradación, ácidos orgánicos y sales. La extracción con agua separa eficazmente los péptidos pequeños y medianos en el queso de las proteínas y péptidos grandes. La cantidad de nitrógeno soluble en agua expresado como porcentaje del N total depende de la variedad de queso, y aumenta con la maduración. El pH aproximado del extracto acuoso de quesos madurados internamente por bacterias (Cheddar, Holandeses, Suizo, Manchego) está en torno a 5,2 y hay muy poca diferencia entre los niveles de nitrógeno soluble en agua y el nitrógeno soluble en tampones a pH 4,6 (Fox, 1989). Sin embargo, en quesos en los que el pH aumenta de forma notable durante la maduración (Camembert, Brie, Azul), el nitrógeno soluble en agua es mucho mayor que el nitrógeno soluble a pH 4,6, por lo cual es aconsejable el ajuste del pH durante el proceso de extracción.

Una vez extraída la fracción de nitrógeno soluble en agua se procede a su fraccionamiento. Hasta la fecha se han utilizado varios agentes precipitantes de las proteínas para fraccionar los extractos solubles en agua o a pH 4,6. Así, se ha utilizado como agente precipitante el ácido tricloroacético (TCA) entre el 2 al 12%, para precipitar péptidos de tamaño mediano y pequeño de la fracción de queso soluble en agua o a pH 4,5-4,6. Una de las desventajas del TCA es la necesidad de eliminarlo antes de proceder al estudio de esta fracción por cromatografía o electroforesis.

Una alternativa es el uso de etanol generalmente al 70%, el cual produce el mismo grado de precipitación que el TCA 12% y presenta la ventaja de que puede ser eliminado fácilmente por evaporación. Otra ventaja del etanol es que a diferencia del TCA, proporciona un fraccionamiento limpio de péptidos entre el sobrenadante y el precipitado (Fox, 1989).

Otros agentes precipitantes más específicos incluyen la mezcla de ácido fosfotúngstico (PTA) y ácido sulfúrico, ácido sulfosalicílico al 5%, o ácido pícrico. La precipitación de los extractos acuosos con una mezcla de PTA/H₂SO₄ se ha utilizado frecuentemente para la preparación de la fracción de nitrógeno aminoacídico y se ha considerado como un buen índice de la maduración (Wilkinson *et al.*, 1992; Bütikofer *et al.*, 1993; Picón *et al.*, 1994; Guinee *et al.*, 1995). En esta fracción son solubles todos los

aminoácidos libres (excepto lisina y arginina) y los péptidos de peso molecular inferior a 600 Da (Jarret *et al.*, 1982). La concentración de PTA más comúnmente utilizada es del 5%.

Bütikofer *et al.* (1993) realizaron un estudio en el cual participaron varios laboratorios europeos, con el fin de establecer una homogeneidad entre las diversas técnicas empleadas para la extracción de las fracciones nitrogenadas en el queso, comprobando que la fracción de nitrógeno soluble en agua, en PTA, en TCA y en etanol fueron las fracciones mejor correlacionadas con el desarrollo del aroma del queso.

Otra forma de evaluar la proteólisis es mediante el estudio de la liberación de grupos amino o carboxilo. La liberación de grupos amino se ha estudiado en queso por la reacción con ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) (Samples *et al.*, 1984), fluorescamina (Creamer *et al.*, 1985) o ninhidrina (Pearce *et al.*, 1988) con resultados satisfactorios. Presentan la ventaja de medir un compuesto producido como consecuencia directa de la proteólisis, como es la formación de grupos amino.

La medida del contenido en tirosina en extractos alcohólicos, en TCA o en extractos acuosos también se ha utilizado para el seguimiento de la proteólisis, bien midiendo la absorbancia a 280 nm o, de una forma más específica, utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteau. Vakaleris y Price (1959), midieron el contenido en tirosina y triptófano solubles en extractos de citrato sódico/HCl de queso por absorbancia a 270 y 290 nm.

Aunque todas las técnicas no específicas anteriores ofrecen una valiosa información de la extensión de la proteólisis y de la actividad de los agentes proteolíticos, dan poca información acerca de los péptidos que se acumulan o son degradados en el queso a lo largo de la maduración. Por esto, se hace necesaria la utilización de técnicas específicas. Así, las técnicas que separan péptidos individuales han sido objeto de estudio en los últimos años (McSweeney y Fox, 1997b).

-Electroforesis

La electroforesis es, posiblemente la técnica más utilizada para estudiar la proteólisis primaria en el queso. El primer estudio se debe a Lindqvist *et al.* (1953), que utilizaron la electroforesis en papel para estudiar la proteólisis en diversas variedades de quesos. Posteriormente, otros investigadores emplearon la electroforesis en geles de almidón (Vreeman y Van Riel, 1990; Van der Berg y De Koning, 1990; De Koning *et al.*, 1992) para la separación de las caseínas y sus productos de degradación en el queso, sin embargo, los geles de almidón son quebradizos y opacos, por lo que han sido reemplazados progresivamente por los geles de poliacrilamida.

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) se aplicó por primera vez en el queso por Melachouris y Tuckey (1966) y Ledford *et al.* (1966). Esta técnica se ha convertido en la técnica electroforética standard. Generalmente se emplean sistemas que contienen urea o dodecil sulfato sódico (SDS) como agentes desnaturalizantes. El uso de la electroforesis para el estudio de la proteólisis en el queso ha sido revisada por Shalabi y Fox (1987). Estos autores compararon la eficiencia de diversos protocolos, tampones y métodos de tinción, y recomendaron el uso de geles de poliacrilamida en tampones Tris (pH 8,9) con un contenido en urea de 4,5 M, y el método de tinción de Blakesley y Boezi (1977) con azul de Coomasie G 250.

Otras técnicas electroforéticas son la electroforesis bidimensional y el isoelectroenfoque. Esta última técnica consiste en la separación de péptidos y proteínas basándose en diferencias en sus puntos isoeléctricos. Algunas de sus aplicaciones incluyen la detección de adulteración de leches de oveja con leches de vaca o cabra (Addeo *et al.*, 1983; 1990a, b; Conti *et al.*, 1988; Moio *et al.*, 1989; Amigo *et al.*, 1992).

Otra de las ventajas de la electroforesis en geles de poliacrilamida es que permite el aislamiento de péptidos del queso por excisión directa de las bandas o bien por “electroblotting”. Esta última técnica es más aconsejable porque permite una mayor recuperación de la proteína, debido a que la excisión ha de hacerse antes del teñido del gel (ya que el tamaño de las bandas puede cambiar tras el teñido). Consiste en la transferencia

de péptidos desde el gel de poliacrilamida a una membrana de polivinildeno-difluoruro usando una célula de transferencia electroforética y aplicando un voltaje constante, procediendo posteriormente al teñido de las bandas. Estos péptidos pueden ser después identificados por secuenciación de su extremo N-terminal (ver más adelante), pero son más difíciles de analizar por espectrometría de masas, ya que no pueden ser teñidos para realizar este análisis y deben ser eluidos desde la matriz del “blotting”.

Una técnica que ha cobrado gran importancia en los últimos años es la electroforesis capilar (EC), debido a que permite separar péptidos procedentes de las caseínas dentro de un amplio rango de pesos moleculares. Consiste en la separación de péptidos en un capilar relleno con tampón bajo la influencia de un campo eléctrico. La separación se produce en base a la carga neta de los péptidos, sus masas y sus radios de Stokes (Young *et al.*, 1992) y a veces, a otras propiedades de los péptidos. La electroforesis capilar presenta un gran potencial para la resolución de mezclas complejas de péptidos. Tiene algunas desventajas respecto a las técnicas electroforéticas tradicionales, como son la elección del tampón y la necesidad de usar instrumentación automática de alta resolución. Los tiempos de separación son relativamente cortos, aunque solo se puede analizar una muestra cada vez. A diferencia de las técnicas electroforéticas convencionales, en las cuales las proteínas y péptidos son visibles por teñido, la electroforesis capilar posee monitorización continua por absorbancia en ultravioleta-visible (UV). Sin embargo, la absorbancia en UV presenta la ventaja de que permite la detección de pequeños péptidos que no son visibles por el teñido, y además es una técnica cuantitativa, a diferencia del resto de técnicas electroforéticas. Existen estudios que emplean esta técnica para el estudio de las proteínas de la leche y del queso (Recio *et al.*, 1996a; Recio *et al.*, 1996b; Molina *et al.*, 1999a; Molina *et al.*, 2000).

-Técnicas cromatográficas

Hasta la fecha se han utilizado numerosas técnicas cromatográficas para la cuantificación de péptidos o aminoácidos en el queso, desde la cromatografía en papel (Kuchroo y Fox, 1982b, 1983a), cromatografía en capa fina sobre gel de sílice (Kuchroo y Fox, 1982b, 1983a,b; Edwards y Kosikowski, 1983; Visser *et al.*, 1983), cromatografía en

columna en distintos medios (Visser *et al.*, 1975; Kuchroo y Fox, 1983a), pero los métodos cromatográficos más utilizados en el análisis de péptidos en el queso son la cromatografía de intercambio iónico y de exclusión, y la cromatografía de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).

Mediante la cromatografía de exclusión en una columna calibrada se pueden estimar los pesos moleculares de péptidos. La muestra a analizar puede ser queso, péptidos de alto peso molecular, extractos de queso solubles en agua o péptidos solubles en PTA y los eluyentes más comunes son agua y tampones diluídos. Los cromatogramas se leen generalmente espectrofotométricamente a longitudes de onda en el rango del UV. La cromatografía de intercambio iónico se usa frecuentemente para el fraccionamiento de proteínas de la leche, pero ha tenido un uso limitado en el análisis del queso (Fox, 1989).

La cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) es una técnica muy versátil y se ha utilizado frecuentemente para caracterizar péptidos en hidrolizados de caseína (Le Bars y Gripon, 1989; McSweeney *et al.*, 1993b) y también para separar péptidos de bajo peso molecular en distintas fracciones de queso. Normalmente se han utilizado extractos solubles en agua para el análisis por RP-HPLC (Cliffe y Law, 1991; González de Llano *et al.*, 1991; McSweeney *et al.*, 1993a), pero también se han estudiado otras fracciones como los extractos soluble e insoluble a pH 4,6 (Kaminogawa *et al.*, 1986; Christensen *et al.*, 1989), el permeato ultrafiltrado de 10 KDa (Singh *et al.*, 1994), las fracciones soluble e insoluble en etanol al 70% (Zarpoutis *et al.*, 1996) y las fracciones procedentes de la cromatografía de exclusión (Cliffe *et al.*, 1993; Molina *et al.*, 1999b). El gradiente de elución más utilizado es el de agua/acetonitrilo o agua/metanol. La detección se realiza generalmente por espectrofotometría en el UV, a una longitud de onda generalmente entre 200 a 230 nm (se mide el grupo carbonilo en el enlace peptídico). El problema que presenta esta técnica es que la comparación de cromatogramas de diferentes estudios es difícil, ya que se utilizan distintas columnas y diferentes condiciones de elución y longitudes de onda. No obstante, la RP-HPLC es muy útil en la separación de péptidos del queso solubles en agua. Debido a la complejidad que presenta la fracción soluble en agua, algunos autores fraccionan este extracto con etanol al 70% previamente al análisis (McSweeney y Fox, 1997b).

Para el análisis de aminoácidos libres generalmente se necesita desproteinizar la muestra para eliminar las interferencias producidas por péptidos. Los reactivos más utilizados son el ácido sulfosalicílico, ácido tricloroacético, etanol, ácido pícrico o $\text{Ba(OH)}_2/\text{ZnSO}_4$. Se añade un patrón interno para facilitar la cuantificación de los aminoácidos.

Actualmente está muy extendido el uso de analizadores de aminoácidos basados en la cromatografía de intercambio iónico, que hacen que la determinación de aminoácidos sea un análisis sencillo, preciso, cuantitativo y requiere poca preparación de la muestra. Los aminoácidos se detectan generalmente por derivatización post-columna, usando a menudo ninhidrina (Ardö y Gripon, 1995; Zarpoutis *et al.*, 1996). También se han determinado aminoácidos libres por derivatización pre-columna en forma de dansil-derivados (Polo *et al.*, 1985), con OPA (ortoftaldehído) (Ramos *et al.*, 1987; Bütikofer *et al.*, 1991) o como FMOC (fluorenilmetil cloroformato) derivados, (Bütikofer *et al.*, 1991), seguido del análisis por RP-HPLC.

También se pueden determinar aminoácidos libres en queso por cromatografía de gases (GC) después de la derivatización con anhídrido heptabutírico (HFBA) con la formación de los n-heptafluorobutiril-isobutil-derivados. Para ello es más apropiada la GC capilar (Wood *et al.*, 1985; Laleye *et al.*, 1987; Bertacco *et al.*, 1992). Las ventajas que presenta esta técnica es que proporciona buenas recuperaciones de aminoácidos añadidos, se pueden analizar todos los aminoácidos de las proteínas, la velocidad y precisión son comparables a las de los analizadores de aminoácidos y el coste del equipamiento es menor a largo plazo. Sin embargo, no es una técnica que se utilice con frecuencia.

Las aminas en el queso se pueden cuantificar por RP-HPLC, usando derivatización pre-columna (Bütikofer *et al.*, 1990) y también por electroforesis capilar (Fernández-García *et al.*, 1999). También la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS) permite la identificación y cuantificación de los compuestos volátiles del queso (Urbach, 1993), incluidos los compuestos resultantes del catabolismo de los aminoácidos.

1.4. QUESOS DE OVEJA: EL QUESO MANCHEGO

Los quesos de oveja deben su tipicidad a la composición de la leche utilizada en su elaboración. La leche de oveja se ha considerado siempre como una leche de características específicas y en ciertos casos, como un producto más noble que las otras leches. La leche de oveja, al igual que la de cabra, está mucho menos estudiada que la leche de vaca.

La Tabla 1.1 muestra la composición global de las leches de oveja, cabra y vaca.

TABLA 1.1: Composición global en % de la leche de oveja, cabra y vaca (Anifantakis, 1986; Ramos y Juárez, 1986).

| COMPONENTES | TIPO DE LECHE | | |
|-----------------|---------------|-------|-------|
| | OVEJA | VACA | CABRA |
| Grasa | 7,09 | 3,86 | 4,37 |
| Proteínas | 5,72 | 3,22 | 3,41 |
| Lactosa | 4,61 | 4,73 | 4,53 |
| Cenizas | 0,93 | 0,72 | 0,63 |
| Sólidos totales | 18,25 | 12,60 | 13,61 |

La leche de oveja se caracteriza por ser especialmente rica en componentes queseros. Así, presenta un contenido en grasa y en proteína casi el doble que las leches de vaca y cabra, de ahí que para cantidades de leche idénticas, se obtenga de media dos veces más de queso con la leche de oveja que con la de vaca.

La leche de oveja presenta un olor y un gusto característicos. Asimismo, los quesos elaborados con leche de oveja poseen un aroma particular y presentan sabores típicos y más intensos que los elaborados con otros tipos de leche.

El color de la grasa de la leche de oveja es netamente blanco, debido a la casi ausencia de caroteno; este pigmento amarillo sí se encuentra en la leche de vaca, debido a esto, los quesos de oveja son más blancos que los de vaca (Kosikowski, 1979).

Los quesos de oveja se pueden clasificar atendiendo a los mismos criterios utilizados para los quesos en general, que han sido descritos anteriormente en este Capítulo.

El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación recoge en el Catálogo de Quesos Españoles (Anónimo, 1990) los siguientes tipos de quesos de oveja: La Bureba, Ansó-Hecho, Cáceres, Castellano, Grazalema, Idiazábal, Mallorquín, Manchego, Oropesa, Pedroches, Roncal, La Serena, Serrat, Torta del Casar y Zamorano. Además, existen otros tipos no incluidos en el Catálogo, como son el queso de Huelva, también llamado de los Montes de San Benito, el queso de Cincho, el de Aragón, el de Cervera, Urbasa y Gorbea.

La producción de los quesos de oveja puede ser industrial o artesanal, siendo esta última difícil de cuantificar dada la situación de clandestinidad en que se encuentran muchas queseras, situadas en zonas donde la ganadería extensiva o semiextensiva con razas autóctonas es la predominante, siendo las regiones de Andalucía y Extremadura donde el queso artesano presenta una de sus mayores potencialidades.

El proceso de elaboración artesanal posee en muchos casos, una serie de características distintivas respecto a la fabricación a escala industrial: la utilización de la leche producida por las ovejas, generalmente de raza autóctona, de la propia explotación; la existencia de unas instalaciones rudimentarias; la estacionalidad de la producción y la disponibilidad de una cantidad restringida de leche (Carmona, 1994), así como la utilización de cuajo natural de origen animal o vegetal y la maduración en las propias salas de las explotaciones ovinas.

En la actualidad, una gran variedad de los quesos de oveja que se fabrican en nuestro país están acogidos a las Denominaciones de Origen, por ejemplo, Manchego, Idiazábal, etc., controlándose así el proceso de fabricación y maduración, otorgando solamente a los mejores quesos la contraetiqueta numerada de su Denominación de Origen.

1.4.1. El queso Manchego

La Mancha es una región con una antigua tradición ganadera. Sus características agroclimáticas han constituido siempre un imperativo ecológico para la explotación del ganado ovino. En algunos yacimientos arqueológicos de la Edad del Hierro y del Bronce se han encontrado restos de huesos y lana de oveja y de encellas así como vasos perforados para escurrir la cuajada y otros utensilios propios para fabricar queso.

“El ingenioso Hidalgo D. Quijote de La Mancha”, de D. Miguel de Cervantes, es el más antiguo documento escrito de notoriedad pública que conocemos que vincula el queso con La Mancha.

Los primeros antecedentes de la Denominación de Origen Queso Manchego datan de 1945, promovida por las actividades de la Junta Provincial de Fomento Pecuario de Ciudad Real, pero no fue hasta el año 1982, cuando el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación reconoce provisionalmente la Denominación de Origen “Queso Manchego”. El 18 de Marzo de 1984 la Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, aprueba el Reglamento de la Denominación de Origen “Queso Manchego” y a efectos de ratificación, se eleva dicho Reglamento al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. El 21 de Diciembre de 1984 el Ministerio ratifica el Reglamento de la D. O. y de su Consejo Regulador y aprueba su publicación en el B.O.E. En la Orden del 23 de noviembre de 1995 se publica la ratificación del Reglamento de la Denominación de Origen “Queso Manchego” y de su Consejo Regulador (BOE 19 de Mayo de 1995).

Según el Reglamento de la Denominación de Origen “Queso Manchego” y de su Consejo Regulador (BOE 19 de Mayo de 1995), se considera queso Manchego el elaborado exclusivamente con leche de oveja de la raza manchega, con una maduración mínima de 60 días, pudiendo ser artesano o industrial según haya sido elaborado con leche cruda o pasteurizada. Es un queso madurado, de semicurado a curado, de coagulación enzimática y de pasta prensada, no cocida y extragraso. Al término de su maduración los quesos Manchegos deben presentar las siguientes características:

A) Características químicas:

- pH: 4,8-5,8
- Extracto seco: mínimo del 55%
- Grasa: mínima del 50% sobre el extracto seco
- Índice de refracción a 40 °C: entre 1,4530-1,4557
- Para la detección de leches extrañas se aplicará la normativa contemplada en el Real Decreto 1533/1991 del 18 de Octubre, por el que se aprueban los métodos oficiales de análisis de leches y productos lácteos.
- Proteína total: mínimo del 30% sobre el extracto seco
- Concentración de NaCl: máximo 2,3%

B) Características físicas:

- Forma: cilíndrica con caras sensiblemente planas
- Altura: 7-12 cm
- Diámetro: 9-22 cm
- Peso: entre 1 y 3,5 Kg
- Corteza: de color amarillo o verdoso negruzco en el caso de que no se limpie la superficie de los mohos desarrollados durante la maduración. La corteza debe presentar las impresiones de los moldes o “pleita” en la superficie lateral y de la “flor” en las caras planas. La corteza se encontrará libre de parásitos.

- Pasta: firme y compacta, de color variable desde el blanco hasta el marfil amarillento, pudiendo presentar pequeños ojos desigualmente repartidos. Aroma y sabor característicos.

C) Características microbiológicas:

- *Escherichia coli*: máximo 1.000 ufc/g
- *Staphylococcus aureus*: máximo 100 ufc/g
- *Salmonella- Shigella*: ausencia en 25 g
- *Listeria monocitogenes*: ausencia en 25 g

Según el Reglamento de la Denominación de Origen Manchego la leche destinada a la elaboración del queso Manchego procederá exclusivamente de ovejas de la raza manchega, siendo el producto natural obtenido del ordeño de las ovejas sanas. Debe estar exenta de calostros y productos medicamentosos que puedan incidir negativamente en la elaboración, maduración y conservación del queso, así como en las condiciones higiénicas y sanitarias del mismo. Las características que debe presentar son:

- Materia grasa: mínimo del 6,5%
- Lactosa: mínimo 4%
- Proteínas: mínimo 4,5%
- Extracto seco: mínimo 11%
- Impurezas macroscópicas: inferior al grado de la Norma UNE 34100
- Acidez: máxima 25 °Dornic
- Prueba de la reductasa con azul de metileno: 3 horas mínimo
- Cenizas: máximo 0,8%

La zona de producción de la leche apta para la elaboración del queso Manchego, así como la de producción y maduración de los mismos se extiende por las provincias de Albacete, Ciudad Real, Cuenca y Toledo.

Para evitar la comercialización de quesos que no son auténticamente Manchegos, se coloca durante el prensado en una de las caras del queso una placa de caseína con el número de serie y la leyenda de “Manchego”, así como una etiqueta expedida por el C.R.D.O.

En la Tabla 1.2 se recogen los datos de las ganaderías y ovejas inscritas, así como de las queserías industriales y artesanales, y de las piezas elaboradas y autorizadas durante el período 1985-1999. Del total de piezas, un 85% corresponde a la elaboración de quesos industriales y el resto, a la de quesos artesanos. Es de destacar el notable aumento de la exportación en los últimos años, siendo Alemania, Francia, Holanda, Reino Unido y Estados Unidos los principales importadores.

1.4.1.1. Proceso de fabricación

En la Figura 1.6 se presenta un esquema de la fabricación del queso de D.O. Manchego.

-Recogida y recepción de la leche

Actualmente, la obtención de la leche se realiza fundamentalmente mediante el ordeño mecánico, aunque aún perdura el ordeño manual en las pequeñas lecherías. Se han venido utilizando recipientes de diversa índole para la recogida de la leche, tales como cubos, jarros y cántaros, de variadas formas y materiales según el lugar de procedencia, siendo los más apropiados y los más utilizados los de aluminio y los de acero inoxidable por su fácil limpieza.

-Enfriamiento y almacenamiento

Una vez realizado el ordeño, la leche se enfría a 3-4 °C y se transporta en cisternas isotermas refrigeradas hasta la fábrica, donde se almacena en silos isotermos. El almacenamiento de la leche no debe ser superior a 2 días hasta el momento de la

elaboración, con el fin de evitar el desarrollo de microorganismos psicrótrofos que puedan incidir de forma negativa en el aroma y en el sabor del producto final.

Tabla 1.2: Producción de queso de D.O. Manchego (Consejo Regulador de la D.O. Manchego)

| Año | Ganaderías inscritas | Queserías | | Piezas elaboradas | Piezas autorizadas | Piezas exportadas |
|------|-------------------------|-----------|----|----------------------|-----------------------|----------------------|
| | | I | A | | | |
| 1985 | 705 | 21 | 22 | 43.968 | 8.898 | - |
| 1986 | 1.025 | 32 | 27 | 427.467 | 226.000 | - |
| 1987 | 1.031 | 33 | 28 | 354.683 | 238.299 | 720 |
| 1988 | 1.458 | 29 | 26 | 602.976 | 545.459 | 18.870 |
| 1989 | 1.147 | 26 | 22 | 826.129 | 705.076 | 30.124 |
| 1990 | 1.282 | 42 | 26 | 808.199 | 721.479 | 54.265 |
| 1991 | 1.337 | 46 | 32 | 916.140 | 853.070 | 58.434 |
| 1992 | 1.358 | 47 | 36 | 947.965 | 861.420 | 75.929 |
| 1993 | 1.372 | 49 | 39 | 1.078.064 | 894.909 | 106.825 |
| 1994 | 1.360 | 40 | 37 | 1.224.535 | 1.149.950 | 146.797 |
| 1995 | 1.195 | 39 | 38 | 1.477.089 | 1.382.050 | 207.638 |
| 1996 | 1.331 | 35 | 38 | 1.601.603 | 1.464.050 | 284.881 |
| 1997 | 1.447 | 37 | 38 | 1.555.157 | 1.508.563 | 278.204 |
| 1998 | 1.539 | 37 | 43 | 1.846.591 | 1.681.645 | 396.938 |
| 1999 | 1.602 | 37 | 43 | 2.097.036 | 2.002.181 | 500.129 |

I: Industriales

A: Artesanales

-Acondicionamiento

A continuación se procede al acondicionamiento de la leche, en el cual se elimina cualquier material extraño que esté presente en la misma mediante filtración a través de una malla o paño fino (en los quesos elaborados de forma tradicional). A nivel industrial, además del filtrado automatizado, se higieniza la leche, centrifugando a alta velocidad para separar las partículas más groseras. También puede ser sometida a tratamientos de bactofugación.

Aunque en las elaboraciones artesanales se puede realizar la elaboración de queso con leche cruda, a nivel industrial la leche requiere ser sometida a la pasteurización. Las condiciones habituales de pasteurización son de 72-74°C/15-20 s. Algunas queserías artesanales aplican tratamientos con temperaturas inferiores durante más tiempo, con el fin de reducir al máximo la presencia de gérmenes que podrían incidir de forma negativa en la maduración del queso.

Si la leche ha sido tratada térmicamente, no sólo se destruye la microbiota patógena sino también la microbiota láctica presente, por lo que es necesaria la adición de cultivos iniciadores o *starter*. El cultivo iniciador se añade a la leche previamente calentada antes de añadir el cuajo, de forma que se produzca una pequeña maduración.

Según la bibliografía revisada, para fabricar queso “tipo Manchego” se suele añadir a la leche previamente calentada a 30 °C, un cultivo iniciador mesófilo en una proporción del 0,5 al 1,5%. Aunque el C.R.D.O. Manchego no especifica cuál debe ser éste, la leche es generalmente inoculada con cultivos comerciales mixtos, los cuales están formados por cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* fermentadores del citrato y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. De estas bacterias lácticas, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* es la única subespecie que se ha encontrado regularmente en el queso Manchego tradicional elaborado con leche cruda y a niveles suficientes como para influir en las características del producto (Núñez *et al.*, 1989).

-Coagulación

El queso Manchego, al igual que la mayoría de los quesos, se fabrica mediante una coagulación mixta, es decir, mediante la acción conjunta del cuajo y de la acidificación causada por la acción de las bacterias lácticas al utilizar como sustrato la lactosa.

Tradicionalmente se usa el cuajo extraído del abomaso de terneros lactantes. Éste se extrae industrialmente por maceración a 20-30 °C durante 3-4 días, en una salmuera al 10% de NaCl adicionada junto con algún antiséptico en pequeña cantidad. El C.R.D.O. Manchego no controla el tipo de cuajo que se debe emplear en la elaboración de esta variedad de queso, por lo que se puede emplear cuajo animal, cuajo vegetal e incluso cuajos de origen fúngico. Picón *et al.* (1994) estudiaron el efecto del uso de quimosina recombinante encapsulada en liposomas de *Kluyveromyces lactis* para la elaboración de queso Manchego, observando que los quesos elaborados con este enzima coagulante presentaron un mayor contenido de péptidos de bajo peso molecular, una mayor resistencia a la rotura, aunque no se consiguió un buen desarrollo del aroma al compararlos con los quesos control.

Junto con la adición del cuajo, en la elaboración del queso Manchego se añaden aproximadamente 2,5 g. de cloruro cálcico por cada 10 L de leche, aunque este parámetro no está controlado por el C.R.D.O.

-Corte, desuerado, moldeado y prensado de la cuajada

Después de la coagulación se procede al corte de la cuajada. En las pequeñas queserías se utilizan utensilios diversos, como las liras. En las instalaciones de mayor industrialización se emplean cortadores de múltiples cuchillas u otros dispositivos con una serie de alambres montados en un marco de acero. La ruptura o corte de la cuajada hay que hacerla lentamente para no deshacer el coágulo, pues de lo contrario se formarían granos irregulares que desueran con dificultad. En la determinación del punto de corte de la cuajada los maestros queseros han venido empleando desde hace muchos años varios métodos empíricos, tales como la observación del grado de adherencia de la cuajada a las

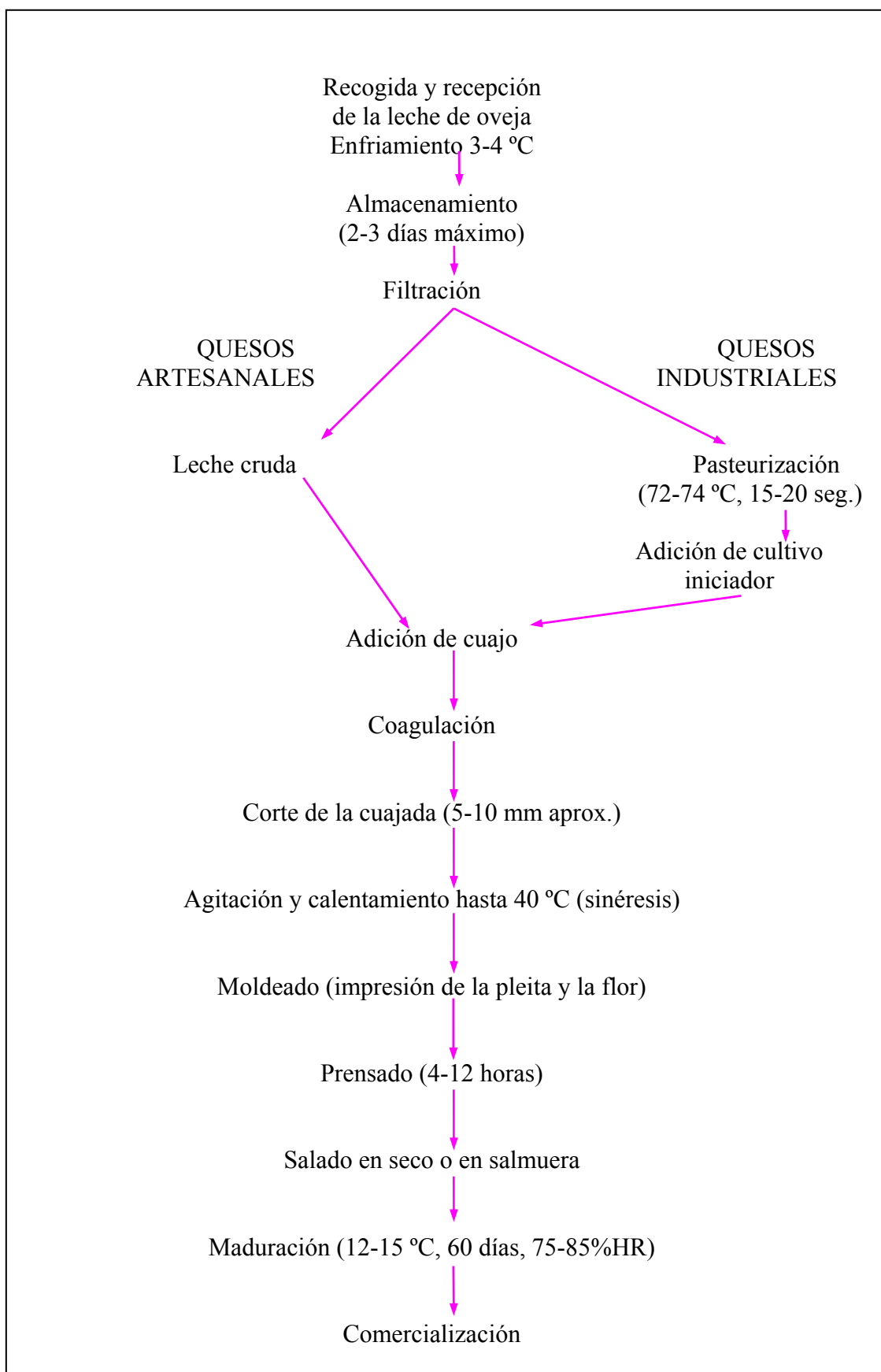


Figura 1.6: Esquema del proceso de fabricación del queso Manchego

paredes de la cuba o a una varilla introducida en la misma. En el queso Manchego, la cuajada obtenida será sometida a cortes sucesivos hasta conseguir granos de tamaño entre 5-10 mm, favoreciéndose así la salida del suero.

A continuación la masa se agita y se recalienta hasta alcanzar de modo paulatino una temperatura máxima de 40 °C. Este aumento de temperatura provoca la concentración de la matriz proteica con la consiguiente eliminación de una nueva fracción de suero y por otro lado, acelera el metabolismo de las bacterias retenidas en la cuajada, con lo cual aumenta la producción de ácido láctico, disminuye el pH y esta acidez facilita la retracción de las partículas, favoreciéndose de nuevo el fenómeno del desuerado. El lactosuero es eliminado por sinéresis, es decir, el coágulo formado se concentra por eliminación de agua y de los constituyentes solubles.

El moldeado consiste en introducir la cuajada en moldes para que los quesos, una vez elaborados, presenten el tamaño, forma, peso y dimensiones características del queso Manchego. Los moldes dispondrán de los adecuados relieves para imprimir en las caras del queso la característica “flor” y en los lados la “pleita”.

A continuación se realiza el prensado del queso, así se extrae el lactosuero que aún puede quedar retenido en la cuajada. Durante esta operación se coloca en una de las caras del queso una placa de caseína suministrada por el C.R.D.O., donde aparece el número de serie para la identificación individual de la pieza. El tiempo de prensado puede oscilar entre 4 y 12 horas, dependiendo del tamaño del queso elaborado. Los sistemas de prensado han evolucionado mucho, pasando de las antiguas prensas de pesas y de husillo a las modernas prensas neumáticas o hidráulicas horizontales y verticales que presan los bordes endureciendo la pasta.

-Salado

Los quesos Manchegos generalmente se salan por inmersión en una salmuera de concentración del 18-20% de NaCl a una temperatura de 10 a 15 °C, durante 48 horas como máximo.

-Maduración

Los quesos Manchegos de D.O. han de tener un período de maduración no inferior a 60 días contados a partir de la fecha de moldeado. Durante este período se aplicarán las prácticas de volteo y limpieza necesarias hasta que el queso adquiera sus características peculiares. La corteza puede adquirir un color verde-negruzco si no se limpian los mohos que se desarrollan en la superficie durante la maduración. El queso madura en cámaras con una humedad relativa del 75-85% y a una temperatura de 12-15 °C.

-Conservación y comercialización

Los quesos amparados por la D.O. únicamente pueden circular y ser expedidos por las queserías e instalaciones inscritas en los tipos de envase que no perjudiquen su calidad y prestigio aprobados por el C.R.D.O. El queso Manchego sólo podrá comercializarse conservando su corteza, las características externas y naturales de la maduración. Podrá ser parafinado o recubierto con sustancias inactivas, transparentes y autorizadas o embadurnados con aceite de oliva, pero en todos los casos, la corteza conservará su color y aspectos naturales y deberá ser legible la impresión de la placa de caseína. En ningún caso se autorizará el empleo de sustancias que proporcionen un color negro. El queso Manchego también puede ser comercializado en cajas de madera de buena calidad.

Otra forma de conservar el queso Manchego muy extendida por toda la geografía manchega es su inmersión en aceite de oliva. Ésta se realizaba fundamentalmente de forma artesanal en los hogares y en establecimientos de restauración, aunque en los últimos años la comercialización de queso Manchego en aceite ha experimentado un notable aumento, debido, fundamentalmente, a que es un producto de alto valor añadido.

1.4.2. Revisión bibliográfica sobre el queso Manchego

Los primeros estudios efectuados sobre el queso Manchego datan de los años 70. Estos primeros trabajos se centraron en el estudio de la microbiota bacteriana presente en el queso Manchego.

Román-Piñana (1975) estudió la microbiota presente a lo largo de la maduración de quesos “tipo Manchego” comerciales elaborados con leche pasteurizada. Los lactococos (antes denominados estreptococos lácticos) constituyeron la flora predominante durante todas las etapas de la maduración. Los micrococcos y levaduras sólo aparecieron en la superficie de los quesos sin parafinar, mientras que los lactobacilos (procedentes fundamentalmente de la microbiota ambiental) alcanzaron al final de la maduración unos recuentos similares a los de lactococos.

Posteriormente se sucedieron una serie de trabajos sobre la microbiota de quesos Manchegos artesanales (Núñez y Martínez-Moreno, 1976) e industriales (Martínez-Moreno y Núñez, 1976), así como una serie de estudios específicos sobre la existencia y proliferación en el queso Manchego de los siguientes géneros de bacterias: estreptococos (ahora lactococos), (Martínez-Moreno, 1976a), lactobacilos, leuconostoc, pediococos (Núñez, 1976a, b, c) y micrococcos (Martínez-Moreno, 1976b).

A estas investigaciones les siguieron otras referentes a la proteólisis primaria (Ramos y Martínez-Castro, 1976; Marcos *et al.*, 1976b; Marcos *et al.*, 1978) y secundaria (Marcos *et al.*, 1976a) experimentada por quesos Manchegos. Se estudiaron por electroforesis los productos de degradación de las caseínas a lo largo de la maduración y se puso de manifiesto en los quesos de oveja que la β -caseína se degradaba en una proporción mucho menor que la α -caseína. Por otro lado, Marcos *et al.* (1976a) encontraron una gran variabilidad en los porcentajes de las distintas fracciones nitrogenadas entre distintas muestras de quesos “tipo Manchego” comerciales. Estas diferencias fueron debidas a la utilización de distintas leches de partida, a diferencias e irregularidades en el proceso de elaboración de los quesos y al diferente grado de maduración del producto a la venta.

Otros estudios han ido encaminados a la detección de posibles adulteraciones de la leche empleada en la elaboración de queso Manchego (adicionando leche de vaca), utilizando distintas técnicas (Ramos, 1976; Ramos *et al.* 1976). La electroforesis en gel de poliacrilamida resultó ser más sensible y dio una mayor resolución que la realizada en

acetato de celulosa, pudiéndose detectar hasta un 5% de leche de vaca en leche de oveja y un 10% de leche de vaca en el queso de oveja.

Como se ha comentado anteriormente, la inmersión del queso Manchego en aceite de oliva es una práctica habitual de conservación del mismo. Existen diversos estudios sobre la microbiota, composición química, proteolisis primaria y secundaria (Ordóñez *et al.*, 1978a), así como del contenido en aminoácidos libres (Ordóñez y Burgos, 1980) y en ácidos grasos (Juárez *et al.* 1980) de quesos Manchegos conservados en aceite de oliva. En estos estudios, se comprobó que a partir del primer mes de conservación en aceite todas las especies de microorganismos estudiadas disminuyeron, excepto los estreptococos (lactococos), que fueron los más abundantes al final de la maduración. Los quesos conservados en aceite mostraron un aumento gradual de la proteolisis primaria y secundaria a lo largo del período de maduración en aceite, que fue superior a la observada para queso Manchego conservado convencionalmente (Ordóñez *et al.* 1978a). Ordóñez y Burgos (1980) encontraron en los quesos Manchegos conservados en aceite de oliva, que todos los aminoácidos libres aumentaron durante la maduración, excepto la arginina, que disminuyó después de los 6 meses de maduración, y el glutámico, que permaneció constante a partir del cuarto mes. Al final de la maduración, los aminoácidos predominantes fueron: lisina, leucina, valina, fenilalanina e isoleucina. En cuanto a los ácidos grasos, Juárez *et al.* (1980) observaron que en el centro del queso la composición en ácidos grasos era la normal para quesos de leche de oveja, sin embargo, debido a la penetración del aceite a través de la corteza del queso, la composición en ácidos grasos de las partes del queso cercanas a la corteza fue diferente, lo cual se reflejó en una mayor proporción de los ácidos oleico y linoleico.

Por otro lado, y con el conocimiento ya existente sobre la microbiota presente en el queso Manchego y sobre su actuación durante la maduración, se sucedieron una serie de estudios acerca de la inclusión de cepas seleccionadas como parte de un cultivo iniciador o *starter* para la elaboración de queso Manchego.

Así, Ramos *et al.* (1981) propusieron un *starter* específico para la elaboración de queso Manchego. En este trabajo se ensayaron 4 combinaciones distintas de diversas

cepas de bacterias lácticas en distintas proporciones, entre ellas, *Streptococcus lactis* (ahora *Lactococcus lactis*), *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus casei* y *Lb. plantarum*. De todos los cultivos *starter* ensayados el que produjo unos quesos de mejor calidad sensorial fue el compuesto por *S. lactis* (97%), *Lb. casei* (1%), *Lb. plantarum* (1%) y *Ln. lactis* (1%). Núñez *et al.* (1981) también estudiaron la adición de diversas cepas de *Streptococcus lactis* como cultivo iniciador para queso tipo Manchego y Núñez *et al.* (1982) utilizaron starters liofilizados concentrados para la fabricación de queso Manchego.

Núñez *et al.* (1984) investigaron la influencia de las condiciones de fabricación (temperatura de cocción, temperatura y tiempo de salado) y de maduración (temperatura de maduración) en la supervivencia de cepas de enterobacterias en el queso Manchego. Las diferencias en el pH debido a la distinta retención de suero en la cuajada (producidas a su vez por las diferentes temperaturas de cocción) influyeron en los recuentos de coliformes totales y fecales. La temperatura de salado no tuvo ningún efecto sobre los recuentos de *Enterobacteriaceae*, mientras que el tiempo de permanencia en la salmuera influyó significativamente en los recuentos de enterobacterias y de coliformes fecales. La temperatura de maduración fue la variable que mostró la mayor influencia en los recuentos de enterobacterias y de coliformes durante todo el período de maduración.

Núñez *et al.* (1986) estudiaron el efecto de las temperaturas de cocción y de maduración sobre la proteólisis y lipólisis del queso Manchego. Los niveles de nitrógeno soluble a pH 4,6, en ácido ticloroacético y en ácido fosfotúngstico de los quesos madurados a 20 °C fueron superiores que los alcanzados por las muestras maduradas a 5 °C. Lo mismo sucedió con el contenido en AGL.

Gaya *et al.* (1983) estudiaron el efecto de la inoculación del queso Manchego con cepas de *St. lactis* (hoy *Lactococcus lactis*). Estos últimos autores con el objetivo de disminuir los recuentos de bacterias pertenecientes al género *Enterobacteriaceae* durante la maduración. Tras 60 días de maduración, los quesos experimentales presentaron unos recuentos significativamente inferiores a los de los quesos control.

Fontecha *et al.* (1994) estudiaron las características bioquímicas de queso Manchego elaborado con un *starter* seleccionado, formado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IFPL 58 (0,5%) y *Lc. lactis* subsp. *cremoris* IFPL 26 (0,5%). El recuento microbiano total fue normal durante la elaboración y la maduración de los quesos. El nivel de nitrógeno no proteico y el de nitrógeno aminoacídico (en % del NT) fueron elevados (73,6 y 1,92%, respectivamente). A los 90 días de maduración, el grado de hidrólisis experimentado por las α_s -caseínas (66%) y de las β -caseínas (17%) produjo unos quesos de características sensoriales y texturales excelentes.

También se ha investigado sobre los cambios en las características microbiológicas, químicas, reológicas y sensoriales del queso Manchego envasado a vacío (Núñez *et al.*, 1986a), llegándose a la conclusión de que el contenido en humedad y las características reológicas se vieron significativamente afectadas por el empaquetamiento a vacío de los quesos realizado tras 1, 2 ó 3 semanas después del salado. El material de embalaje no tuvo ningún efecto sobre las características del queso; aunque los quesos envasados a vacío presentaron una menor intensidad del sabor, no hubo diferencias en cuanto a la calidad del sabor entre los quesos envasados a vacío y los quesos control.

También existen estudios sobre el comportamiento y supervivencia de *Staphylococcus aureus* en el queso Manchego con diferentes condiciones de maduración (Gaya *et al.*, 1984; 1988; Núñez *et al.*, 1988).

Gaya *et al.* (1990) estudiaron el efecto del aumento de la temperatura para acelerar la maduración del queso Manchego.

Más recientemente, se han sucedido una serie de trabajos en los que se ha estudiado la influencia de ciertas actividades enzimáticas microbianas específicas en las características de queso Manchego a lo largo de la maduración, como son el efecto de la adición de proteinasa neutra (Núñez *et al.*, 1991) y de enzimas procedentes de *Aspergillus oryzae* (Fernández-García *et al.*, 1993) para acelerar la maduración, el efecto de la activación del sistema lactoperoxidasa (Uceda *et al.*, 1994), el empleo de enzimas proteolíticas y lipolíticas (Fernández-García *et al.*, 1994), el efecto de la adición de una

proteínasa neutra de *Bacillus subtilis* encapsulada en liposomas (Picón *et al.*, 1995), la actividad inhibitoria de la nisina producida por un *starter* sobre *Listeria innocua* en el queso durante la maduración (Rodríguez *et al.*, 1998), el efecto de la cisteína proteinasa aislada de *Micrococcus sp.* INIA 528 en la maduración del queso Manchego (Mohedano *et al.*, 1998), el efecto de la adición de proteinasas sobre la formación de aminas biógenas (Fernández-García *et al.*, 1999), la adición de cultivos iniciadores definidos y de cultivos iniciadores comerciales mixtos en quesos Manchegos elaborados con leche cruda y pasteurizada (Gómez *et al.*, 1999), así como la formación de péptidos hidrófilos e hidrófobos durante la maduración de quesos Manchegos elaborados utilizando distintos coagulantes (Gaya *et al.*, 1999).

También existen estudios recientes sobre el salado del queso tipo Manchego mediante un método por impregnado a vacío (Chiralt y Fito, 1997; Guamis *et al.*, 1997; Pavía *et al.*, 1999a; Pavía *et al.*, 1999b; González *et al.*, 1999).

Por último en nuestro grupo de investigación se ha trabajado en las siguientes líneas de investigación: identificación y propiedades tecnológicas de la microbiota del queso Manchego (García *et al.*, 1995, 1997); electroforesis, predicción del tiempo de maduración del queso Manchego (García-Ruiz y Cabezas, 1995; García-Ruiz *et al.*, 1998); proteólisis en queso Manchego conservado en aceite de oliva (Poveda *et al.*, 1999a); composición en ácidos grasos libres y combinados de queso Manchego durante la maduración (Poveda *et al.*, 1999b; Poveda *et al.*, 2000) y análisis sensorial de quesos Manchegos y otras variedades de quesos europeos (González-Viñas *et al.*, 2001).

1.5. BIBLIOGRAFÍA

- Adda, J., Gripon, J. C. y Vassal, L. (1982). The chemistry of flavour and texture development in cheese. *Food Chemistry* 9, 115-129.
- Addeo, F., Chianese, L., Di Luccia, A., Petrilli, P., Mauriello, R. y Anelli, G. (1983). Identification of bovine casein variants by gel isoelectric focusing. *Milchwissenschaft* 38, 586-588.
- Addeo, F., Moio, L. Chianese, L., Stingo, C. Resmini, E., Berner, I., Krause, D., Di Luccia, A. y Bocca, A. (1990b). Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine cheese by gel isoelectric focusing of γ -caseins. *Michwissenschaft* 45, 708-711.
- Addeo, F., Moio, L. Chianese, L., Stingo, C. y Di Luccia, A. (1990a). Improved procedure for detecting bovine and ovine milk mixtures in cheese by isoelectric focusing on para- κ -casein. *Michwissenschaft* 45, 221-224.
- Amigo, L., Ramos, M., Calhau, L. y Barbosa, M. (1992). Comparison of electrophoresis, isoelectric focusing and immunodiffusion in determination of cow's and goat's milk in Serra da Strela cheeses. *Lait* 72, 95-101.
- Anifantakis, E. M. (1986). Phisico-chemical properties of ewe milk and compared of cow milk. *International Dairy Federation Documents* 202, 42-43.
- Anónimo (1990). Catálogo de Quesos Españoles. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Anónimo (1991). Código Alimentario Español. Ed. Boletín Oficial del Estado. Colección textos legales, 6ª Ed., Madrid, 105.
- Ardö, Y. y Gripon, J. C. (1995). Comparative study of peptidolysis in some semi-hard round-eyed cheese varities with different fat contents. *Journal of Dairy Research* 62, 543-547.

- Aston, J. W., Greive, P. A., Durward, I. G. Y Dulley, J. R. (1983). Proteolysis and flavour development in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* 38, 55.
- Bastian, E. D. y Brown, R. J. (1996). Plasmin in milk and dairy products: An update. *International Dairy Journal* 6, 435-457.
- BDI (1985). Standard methods for the examination of dairy products. 15th Am. Pub. Health Assoc. Inc. New York.
- Bertacco, G., Boschella, O. y Lercker, G. (1992). Gas chromatographic determination of free amino acids in cheese. *Milchwissenschaft* 47, 348-350.
- Bhowmik, T. y Marth, E. H. (1990). Esterases of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: Identification and partial characterization. *Journal of Dairy Science* 73, 33-40.
- Bines, V. E., Young, P. y Law, B. A. (1989). Comparison of Cheddar cheese made with a recombinant calf chymosin and with standard calf rennet. *Journal of Dairy Research* 56, 657-664.
- Blakesley, R. W. y Boezi, J. A. (1977). A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue G250. *Analitical Biochemistry* 82, 580-582.
- BOE 19 de Mayo 1995. Reglamento de la Denominación de Origen “Queso Manchego” y de su Consejo Regulador. Orden del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 11 de Diciembre de 1995.
- Bouton, Y. y Grappin, R. (1995). Comparaison de la qualité de fromages à pâte pressée cuite fabriqués á partir de lait cru ou microfiltré. *Lait* 75, 31-44.
- Breen, E. D., Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (1995). Fractionation of water-soluble peptides from Cheddar cheese. *Italian Journal of Food Science* 7, 211-220.

- Broome, M. C., Krause, D. A. Y hickey, M. W. (1990). The use of non-arter lactobacilli in Cheddar cheese manufacture. *Australian Journal of Dairy Technology* 45, 67-73.
- Bütikofer, U., Fuchs, D., Bosset, J. O. y Gmur, W. (1991). Automated HPLC-amino acid determination by precolumn derivatization with OPA and FMOC and comparison with classical ion-exchange chromatography. *Chromatographia* 31, 441-447.
- Bütikofer, U., Fuchs, Murni, D. y Bosset, J. O. (1990). Beitrag zur Bestimmung biogener Amine in Käse. Vergleich einer verbesserten HPLC-mit einer IC-Methode und Anwendung bei verschiedenen Kasesorten. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters Hyg.* 81, 120-133.
- Bütikofer, U., Ruegg, M. y Ardo, Y. (1993). Determination of nitrogen fractions in cheese, evaluation of a collaborative study. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 26, 271-275.
- Cabezas, L. (1980). Ensayos sobre el coagulante de la leche del cardo *Cynara humilis*. Tesina de licenciatura. Facultad de Ciencias. Sección Biológicas. Universidad de Córdoba.
- Carmona, M. A. (1994). Adición de cultivos iniciadores y condiciones de maduración en la fabricación de queso de oveja artesano. Características químicas y sensoriales. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Chiralt, A. y Fito, P. (1997). Salting of Manchego-type cheese by vacuum impregnation. P. Fito, G. Barbosa y E. Ortega, *Food Engineering 2000*. New York: Chapman & Hall.
- Christensen, J. E., Jonhson, M. E. Y Steel, J. L. (1995). Production of Cheddar cheese using *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK 11 derivative with enhanced aminopeptidase activity. *International Dairy Journal* 5, 367.

- Christensen, T. M. I. E., Kristiansen, K. R. y Madsen, J. S. (1989). Proteolysis in cheese investigated by high performance liquid chromatography. *Journal of Dairy Research* 56, 823-828.
- Cliffe, A. J. y Law, B. A. (1991). A time course study of peptide production in accelerated-ripened Cheddar cheese using reverse phase high performance liquid chromatography. *Food Biotechnology* 5, 1-17.
- Cliffe, A. J., Marks, J. D. y Mulholland, F. (1993). Isolation and characterization of non-volatile flavours from cheese, peptide profile of flavour fractions from Cheddar cheese, determined by reverse phase high-performance liquid chromatography. *International Dairy Journal* 3, 379-387.
- Cogan, T. M. (1987). Co-metabolism of citrate and glucose by *leuconostoc spp.*: Effects on growth, substrates and products, *Journal of Applied Bacteriology* 63, 551-558.
- Cogan, T. M. y Daly, C. (1987). Cheese starter cultures. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1, 2nd ed., P. F. Fox (ed.) Chapman & Hall, London.
- Cogan, T. M. y Hill, C. (1993). Cheese starter cultures. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1, 2nd edn., P. F. Fox, ed. Chapman & Hall, London.
- Considine, T., Healy, A., Kelly, A. L. y McSweeney, P. L. H. (1998). Proteolytic specificity of elastase on bovine β -casein. *Food Chemistry* 66, 463-470.
- Contarini, G., Zucchetti, S., Amelotyi, G. y Toppino, P. M. (1989). Metodiche analitiche e gascromatografiche per la valutazione della frazione acidica libera nei prodotti lattiero-caseari. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 66, 561-567.
- Conti, A., Napolitano, L., Cantisani, S. M., Davoli, R. y Dall-Olio, S. (1988). Bovine beta-lactoglobuline H-isolation by preparative isoelectric-focusing in immobilized pH gradients and preliminary characterization. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 16, 205-214.

- Cousins, C. M., Sharpe, M. E. y Law, B. A. (1977). The bacteriological quality of milk for Cheddar cheesemaking. *Dairy industries International* 42, 12.
- Creamer, L. K., Lawrence, R. C. y Gilles, J. (1985). Effect of acidification of cheese milk on the resultant Cheddar cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 20, 185-203.
- Dalgleish, D. G. (1993). The enzymatic coagulation of milk. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Volume 1, P. F. Fox, ed. Chapman & Hall, London.
- De Jong, C. y Badings, H. T. (1990). Determination of free fatty acids in milk and cheese. *High Resolution Chromatography & Chromatography Communications* 13, 94-98.
- De Koning, P. J., de Wit, J. N. y Driessen, F. M. (1992). Process conditions affecting age-thickening and gelation of sterilized canned evaporated milk. *Netherland Milk Dairy Journal* 46, 3-18.
- De la Fuente, M. A. y Juárez, M. (1993). Revisión: Determinación de ácidos grasos libres en productos lácteos. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 33, 247-269.
- Deeth, H. C. y Fitzgerald, C. H. (1976). Lipolysis in dairy products: a review. *Australian Journal of Dairy Technology* June, 53-61.
- Driessen, F. M. (1989). Heat inactivation of lipases and proteinases (indigenous and bacterial). *Heat-induced changes in milk*, Bulletin 238, International Dairy Federation, Brussels.
- Dybing, S. T., Wiegand, J. A., Brudvig, S. A., Huang, E. A. y Chandan, R. C. (1988). Effect of processing variables on the formation of calcium lactate crystals on Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 71, 1701-1710.
- Edwards, J. y Kosikowski, F. V. (1983). Bitter compounds from Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 66, 727-734.

- Farkye, N. Y. y Fox, P. F. (1992). Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin. *Journal of Dairy Research* 59, 209.
- Fernández-García, E, Olano, A., Cabezudo, D., Martín-Alvarez, P. J. y Ramos, M. (1993). Accelerated ripening of Manchego type cheese by added commercial enzyme preparation from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microbiology and Technology* 15, 519-524.
- Fernández-García, E., López-Fandiño, R, Alonso, L. y Ramos, M. (1994). The use of lipolytic and proteolytic enzymes in the manufacture of Manchego cheese from ovine and bovine milk. *Journal of Dairy Science* 77, 2139-2149.
- Fernández-García, E., Tomillo, J. y Núñez, M. (1999). Effect of added proteinases and level of starter culture on the formation of biogenic amines in raw milk Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 52, 189-196.
- Foda, F. A., Hammond, E. G., Reinbold, G. W. y Hotchkiss, D. K. (1974). Role of fat in flavor of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 57, 1137.
- Folkertsma, B, Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (1996). Acceleration of Cheddar cheese ripening at elevated temperatures. *International Dairy Journal* 6, 1117.
- Fontecha, J., Peláez, C. y Juárez, M. (1994). Biochemical characteristics of a semi-hard ewe's milk cheese. *Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung Forschung* 198, 24-28.
- Fox, P. F. (1989). Proteolysis in cheese during manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science* 72, 1379-1400.
- Fox, P. F. (1993). Cheese: an overview. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Volume 1, P. F. Fox, ed. Chapman & Hall, London.
- Fox, P. F. y Mcsweeney, P. L. H. (1996). Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International* 12, 457-509.
- Fox, P. F. y Stepaniak, L. (1993). Enzymes in cheese technology. *International Dairy Journal* 3, 609.

- Fox, P. F. y Wallace, J. M. (1997). Formation of flavour compounds. *Advances in Applied Microbiology* 45, 17-85.
- Fox, P. F., Guinee, T. M., Cogan, T. M. y McSweeney, P. L. H. (2000). Biochemistry of Cheese Ripening. *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers, Inc., Maryland.
- Fox, P. F., Lucey, J. A. y Cogan, T. M. (1990). Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *CRC Critical Reviews of Food Science and Nutrition* 29, 237-253.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. y Singh, T. K. (1995b). Methods for assesing proteolysis in cheese during ripening. *Chemistry of Structure/Function Relationships in Cheese*. Vol. 367, E. L. Malin & M. H. Tunick (eds.), Plenum Press, London.
- Fox, P. F., Singh, T. K. y McSweeney, P. L. H. (1994). Proteolysis in cheese during ripening. *Biochemistry of Milk Products*, A. T. Andrews & J. Varley, eds. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Fox, P. F., Singh, T. K. y McSweeney, P. L. H. (1995a). Biogenesis of flavour compounds in cheese. *Chemistry of Structure/Function Relationships in Cheese*, vol. 367, E. L. Malin and M. H. Tunik (eds), Plenum Press, London.
- García, A., Cabezas, L. y Palop, M. L. (1995). Identificación de la flora láctica en quesos de denominación de origen Manchego. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 13, 275-280.
- García, A., Palop, M. L. y Cabezas, L. (1997). Properties of lactic acid bacteria isolated from Manchego cheeses suitable for industrial applications. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 15, 237-240.
- García, H. S., Reyes, H. R., Malcata, F. X., Hill, C. G. y Amundson, C. H. (1990). Determination of the major free fatty acids in milkfat using a three-component mobile phase for HPLC analysis. *Milchwissenschaft* 45, 757-759.

- García-Ruiz, A. y Cabezas, L. (1995). Estudio de las diferencias entre la elaboración artesanal e industrial de quesos Manchegos acogidos a la Denominación de Origen. *Alimentación, Equipos y Tecnología* Julio-Agosto, 43-48.
- García-Ruiz, A., Cabezas, L., Martín-Álvarez, P. J. y Cabezudo, M. D. (1998). Prediction of the ripening times of Manchego cheese using multivariate statistical analyse: a preliminary study. *Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung Forschung A* 206, 382-386.
- Gaya, P., Carrera, E., Medina, M. y Núñez, M. (1999). Formation of hydrophobic and hydrophilic peptides during the manufacture of ewes' milk Manchego cheese using different milk coagulants. *Milchwissenschaft* 54, 556-558.
- Gaya, P., Medina, M. y Núñez, M. (1983). Accelerated decrease of *Enterobacteriaceae* counts during ripening of raw milk Manchego cheese by lactic culture inoculation. *Journal of Food Protection* 46, 305-308.
- Gaya, P., Medina, M., Bautista, L. y Núñez, M. (1984). Survival of *Staphylococcus aureus* in raw sheep milk Manchego cheeses ripened at different temperatures. *53rd Annual Meeting Society of Applied Bacteriology*, Lancaster.
- Gaya, P., Medina, M., Bautista, L. y Núñez, M. (1988). Influence of lactic starter inoculation, curd heating and ripening temperature on *Staphylococcus aureus* behavior in Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology* 6, 249-257.
- Gaya, P., Medina, M., Rodríguez-Marín, M. A. y Núñez, M. (1990). Accelerated ripening of ewes' milk Manchego cheese: The effect of elevated ripening temperatures. *Journal of Dairy Science* 73, 26-32.
- Gómez, M. J., Rodríguez, E., Gaya, P., Núñez, M. y Medina, M. (1999). Characteristics of Manchego cheese manufactured from raw and pasteurized ovine milk and with defined-strain or commercial mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science* 82, 2300-2307.

- González de Llano, D., Ramos, M. y Martín-Álvarez, P. J. (1991). Comparative study of different methods for evaluating proteolysis in blue cheese. *Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung Forschung* 196, 29-31.
- González, Ch., Fuentes, C., Andrés, A., Chiralt, A. y Fito, P. (1999). Effectiveness of vacuum impregnation brining of Manchego-type curd. *International Dairy Journal* 9, 143-148.
- González-Viñas, M. A., Poveda, J. M. y Cabezas, L. (2001). Sensory and chemical evaluation of Manchego cheese and other cheese varieties available in the Spanish market. *Journal of Food Quality* 24, 157-165.
- Grappin, R. T., Rank, T. C. and Olson, N. F. (1985). Primary proteolysis during ripening. *Journal of Dairy Science* 68, 531-540.
- Gray, I. K. (1975). The quantitative analysis of free fatty acids in dairy products. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 10, 158-162.
- Gripon, J. C., Monnet, V., Lamberte, G y Desmazeaud, M. J. (1991). Microbial enzymes in cheese ripening. *Food Enzymes*, P. F. Fox (ed.), Elsevier Applied Science, London.
- Gruferty, M. B. y Fox, P. F. (1988). Milk alkaline proteinase: A review. *Journal of Dairy Research* 55, 609-630.
- Guamis, B., Trujillo, A. J., Ferragut, V., Chiralt, A., Andrés, A. y Fito, P. (1997). Ripening control of Manchego type cheese salted by brine vacuum impregnation. *International Dairy Journal* 7, 185-192.
- Guinee, T. P. y Fox, P. F. (1993). Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Volume 1, P. F. Fox, ed. Chapman & Hall, London.
- Guinee, T. P., Pudja, P. D., Reville, W. J., Harrington, D., Mulholland, E. O, Cotter, M. y Cogan, T. M. (1995). Composition, microstructure and maturation of semihard

- cheeses from high protein ultrafiltered milk retentates with different levels of denatured whey proteins. *International Dairy Journal* 5, 543-568.
- Harper, W. J., Schwartz, D. P. y Hagarawi, I. J. (1956). A rapid silica gel method for measuring total free fatty acids in milk. *Journal of Dairy Science* 39, 46-50.
- Hemme, D., Bouillane, C., Metro, F. y Desmazeaud, M. J. (1982). Microbial catabolism of amino acids during cheese ripening. *Science des Aliments* 2, 113-123.
- Holsinger, V. H., Smith, P. W. y Tunik, M. H. (1995). Overview: cheese chemistry and rheology. *Chemistry of Structure-Function Relationships in Cheese*, E. L. Malin & M. H. Tunik, eds, Plenum Press, Nueva York.
- Huffman, L. M. y Kristofersen, T. (1984). Role of lactose in Cheddar cheese manufacture and ripening. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 19, 151-162.
- Jarret, W. D., Aston, J. W. y Dulley, J. R. (1982). A simple method for stimating free amino acids in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* 37, 55-58.
- Juárez, M., De la Fuente, M. A. y Fontecha, J. (1992). Improved gas chromatographic method for the determination of the individual free fatty acids in cheese using a capillary column and PTV injector. *Chromatographia* 33, 351-356.
- Juárez, M., Martínez-Castro, I. y Ramos, M. (1980). Composición en ácidos grasos de quesos Manchegos conservados en aceite. *Proceeding 3er Congreso Nacional de Química y Tecnología de Alimentos*, Sevilla. 179-185.
- Kaminogawa, S., Yamauchi, K., Miyazawa, S. y Koga, Y. (1980). Degradation of casein components by acid protease of bovine milk. *Journal of Dairy Science* 63, 701.
- Kaminogawa, S., Yan, T. R., Azuma, N. y Yamauchi, K. (1986). Identification of low molecular weight peptides in Gouda-type cheese and evidence for the formation of these peptides from 23-N-terminal residues of α_{s1} -casein by proteinases of *Streptococcus cremoris* H61. *Journal of Food Science* 51, 1253-1256.

- Karahadian, C. y Lindsay, R. C. (1987). Integrated roles of lactate, ammonia and calcium in texture development of mould surface-ripened cheese. *Journal of Dairy Science* 70, 909-918.
- Kinsella, J. E. y Hwang, D. H. (1977). Enzymes of *Penicillium roqueforti* involved in the biosynthesis of cheese flavor. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 8, 191-228.
- Koch, N., Prokopek, D. y Krusch, V. (1986). Manufacture of semihard cheese using chymosin produced by genetic engineering. *Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 38, 193-197.
- Kosikowski, F.V. (1979). Cheese and fermented milk foods, 3rd ed. Edwards Brothers, Michigan.
- Kuchroo, C. N. y Fox, P. F. (1982a). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft* 37, 331-335.
- Kuchroo, C. N. y Fox, P. F. (1982b). Fractionation of water-soluble nitrogen from Cheddar cheese: chemical methods. *Milchwissenschaft* 37, 651-653.
- Kuchroo, C. N. y Fox, P. F. (1983a). Fractionation of the water-soluble nitrogen from Cheddar cheese: chromatographic methods. *Milchwissenschaft* 38, 76-79.
- Kuchroo, C. N. y Fox, P. F. (1983b). A fractionation scheme for the water-soluble nitrogen in Cheddar cheese. *Milchwissenschaft* 38, 389-391.
- Kungi, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. y Konings, W. N. (1996). The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antoine Van Leeuwenhoek* 70, 187-221.
- Laleye, L. C., Simard, R. E., Grosselin, C., Lee, B. H. y Giroux, R. N. (1987). Assessment of Cheddar cheese quality by chromatographic analysis of free amino acids and biogenic amines. *Journal of Food Science* 52, 303-307, 311.

- Lamberet, G. y Lenoir, J. (1976). Les caracteres du systeme lipolytique de l'espece *Penicillium caseicolum*. Purification et proprietes de la lipase majeure. *Lait* 56, 622-644.
- Lau, K. Y., Barbano, D. M. y Rasmussen, R. E. (1991). Influence of pasteurization of milk on protein breakdown in Cheddar chees during aging. *Journal of Dairy Science* 74, 727-740.
- Lawrence, R. C., Creamer, L. K. y Gilles, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 70, 1748-1760.
- Le Bars, D. y Gripon, J. C. (1989). Specificity of plasmin towards bovine α_{s2} -casein. *Journal of Dairy Research* 56, 817-821.
- Leaver, J., Law, A. J. R., Horne, D. S. y Banks, J. M. (1995). Influence of heating regime and pH on the primary phase of renneting of whole milk. *International Dairy Journal* 5, 129-140.
- Ledford, R. A., O'Sullivan, A. C. y Nath, K. R. (1966). Residual casein fractions in ripened cheese determined by polyacrylamide-gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science* 49, 1098-1101.
- Lindqvist, B., Storgards, T. y Goransson, M. B. (1953). Electrophoresis in paper as a mean of studying the ripening process in cheese. *Proceedings 13th International Dairy Congress*, The Hague, 3, 1261-1268.
- Lynch, C. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cogan, T. M. y Drinan, F. D. (1996). Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal* 6, 851-867.
- Lynch, C. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cogan, T. M. y Drinan, F. D. (1997). Contribution of starter and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with controlled microflora. *Le Lait* 77, 441-459.
- Macedo, A. C. y Malcata, F. X. (1996). Changes in the major free fatty acids in Serra cheese throughout ripening. *International Dairy Journal* 6, 1087-1097.

- Marcos, A., Esteban, M. A., Fernández-Salguero, J., Mora, M. T. y Millán, R. (1976a). Componentes nitrogenados del queso tipo Manchego: I. Análisis químico de las principales fracciones. *Anales de Bromatología* XXVIII-1, 57-68.
- Marcos, A., Esteban, M. A., Fernández-Salguero, J., Mora, M. T. y Millán, R. (1976b). Componentes nitrogenados del queso tipo Manchego: II. Electroforesis en gel de poliacrilamida. *Anales de Bromatología* XXVIII-1, 69-80.
- Marcos, A., Fernández-Salguero, J. y Esteban, M. A. (1978). Hidrólisis relativa de las caseínas del queso Manchego maduro y primeros productos de su degradación proteolítica. *Archivos de Zootecnia* 27, 341-349.
- Martínez-Castro, I, Alonso, L. y Juárez, M. (1986). Gas chromatographic analysis of free fatty acids and glycerides of milk fat using tetramethylammonium hydroxide as catalyst. *Cromatographia* 21, 37-40.
- Martínez-Moreno, J. L. (1976a). Flora microbiana del queso Manchego: III. Estreptococos. *Anales del INIA, Serie General*, 4, 41-56.
- Martínez-Moreno, J. L. (1976b). Flora microbiana del queso Manchego: VII. Micrococos. *Anales del INIA, Serie General*, 4, 83-92.
- Martínez-Moreno, J. L. y. Núñez, M. (1976). Flora microbiana del queso Manchego: II. Evolución de la flora microbiana de quesos Manchegos industriales. *Anales del INIA, Serie General*, 4, 33-40.
- Martín-Hernández, M. C., Alonso, L., Juárez, M. y Fontecha, J. (1988). Gas chromatographic method for determining free fatty acids in cheese. *Cromatographia* 25, 87-90.
- McGarry, A., Law, J., Coffey, A., Daly, C., Fox, P. F. y Fitzgerald, G. F. (1994). Effect of genetically modifying the lactococcal proteolytic system in ripening and flavour development in Cheddar cheese. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 4226.

- McNeill, G. P. y Connolly, J. F. (1989). A method for the quantification of individual free fatty acids in cheese: Application to ripening of Cheddar-type cheeses. *Irish Journal of Food Science and Technology* 13, 119-128.
- McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (1997a). Indices of Cheddar cheese ripening, pp. 73-89. *Proceedings of the 5th Cheese Symposium*, Moorepark, Fermoy, Co. Cork.
- McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (1997b). Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait* 77, 41-76.
- McSweeney, P. L. H., Fox, P. F. y Olson, P. F. (1995). Proteolysis of bovine caseins by cathepsin D: Preliminary observations and comparison with chymosin. *International Dairy Journal* 5, 321-336.
- McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Lucey, J. A., Jordan, K. M. y Cogan, T. M. (1993a). Contribution to the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 3, 613-634.
- McSweeney, P. L. H., Olson, N. F., Fox, P. F., Healy, A. y Hojrup, P. (1993b). Proteolytic specificity of chymosin on bovine α_{s1} -casein. *Journal of Dairy Research* 60, 401-412.
- Melachouris, N. P. y Tuckey, S. L. (1966). Changes in the proteins in Cheddar cheese made from milk heated at different temperatures. *Journal of Dairy Science* 49, 800-805.
- Metcalf, L. D. y Wang, C. N. (1981). Rapid preparation of fatty acid methyl esters using organic base-catalyzed transesterification. *Journal of Chromatography Science* 19, 530-535.
- Mohedano, A. F., Fernández, J., Garde, S., Medina, M., Gaya, P. y Núñez, M. (1998). The effect of the cysteine proteinase from *Micrococcus* sp. INIA 528 on the ripening process of Manchego cheese. *Enzyme and Microbial Technology* 22, 391-396.

- Moio, L., Di Luccia, A. y Addeo, F. (1989). Fast isoelectric-focusing of milk-proteins on small ultrathin polyacrylamide gels containing urea. *Electrophoresis* 10, 533-535.
- Molina, E., de Frutos, M. y Ramos, M. (2000). Capillary electrophoresis characterization of the casein fraction of cheeses made from cows', ewes' and goats' milks. *Journal of Dairy Research* 67, 209-216.
- Molina, E., Martín-Álvarez, P. J. y Ramos, M. (1999a). Analysis of cows', ewes' and goats' milk mixtures by capillary electrophoresis: quantification by multivariate regression analysis. *International Dairy Journal* 9, 99-105.
- Molina, E.; Ramos, M., Alonso, L. y López-Fandiño, R. (1999b). Contribution of low molecular weight water soluble compounds to the taste of cheeses made of cows', ewes' and goats' milk. *International Dairy Journal* 9, 613-621.
- Núñez, M, Guillén, A. M., Rodríguez-Marín, M. A., Marcilla, A. M., Gaya, P. y Medina, M. (1991). Accelerated ripening of ewe's milk Manchego cheese: the effect of neutral proteinase. *Journal of Dairy Science* 74, 4108-4118.
- Núñez, M, Medina, M., Gaya, P., Guillén, A. M. y Rodríguez-Marín, M. A. (1992). Effect of recombinant chymosin on ewe's milk coagulation and Manchego cheese characteristics. *Journal of Dairy Research* 59, 81-87.
- Núñez, M. (1976a). Flora microbiana del queso Manchego: IV. Lactobacilos. An. INIA, Ser. General, 4, 57-65.
- Núñez, M. (1976b). Flora microbiana del queso Manchego: V. Leuconostoc. *Anales del INIA, Serie General* 4, 67-74.
- Núñez, M. (1976c). Flora microbiana del queso Manchego: VI. Pediococos. *Anales del INIA, Serie General* 4, 75-81.
- Núñez, M. y Martínez-Moreno, J. L. (1976). Flora microbiana del queso Manchego: I. Evolución de la flora microbiana de quesos Manchegos artesanales. *Anales del INIA, Serie General* 4, 11-31.

- Núñez, M., Bautista, L., Medina, M. y Gaya, P. (1988). *Staphylococcus aureus*, thermonuclease and staphylococcal enterotoxins in raw ewes' milk Manchego cheese. *Journal of Applied Bacteriology* 65, 29-34.
- Núñez, M., García-Aser, C., Rodríguez-Marín, M. A, Medina, M y Gaya, P. (1986). The effect of ripening and cooking temperatures on proteolysis and lipolysis in Manchego cheese. *Food Chemistry* 21, 115-123.
- Núñez, M., Gaya., P. y Medina, M. (1984). Influence of manufacturing and ripening conditions on the survival of Enterobacteriaceae in Manchego cheese. *Journal of Dairy Science* 68, 794-800.
- Núñez, M., Gaya., P., Medina, M., Rodríguez-Marín, M. A. y García-Aser, C. (1986a). Changes in microbiological, chemical, rheological and sensory characteristics during ripening of vacuum packaged Manchego cheese. *Journal of Food Science* 51, 1451-1455.
- Núñez, M., Martínez-Moreno, J. L. y Medina, M. (1981). Ensayo de diversas cepas de *Streptococcus lactis* de diversa capacidad acidificante como fermentos para queso tipo Manchego. *Anales del INIA, Serie General* 12, 65-72.
- Núñez, M., Medina, M. y Gaya, P. (1989). Ewes' milk cheese: technology, microbiology and chemistry. *Journal of Dairy Research* 56, 303-321.
- Núñez, M., Núñez, J. A: y Medina, M. (1982). Freeze-dried concentrated starters for direct inoculation of vat milk in Manchego cheese manufacture. *Milchwissenschaft* 37, 328-330.
- O'Sullivan, M. y Fox, P. F. (1990). A scheme for partial fractionation of cheese peptides. *Journal of Dairy Research* 57, 135-139.
- Ohren, J. A. y Tuckey, S. L. (1967). Relation of flavour development in Cheddar cheese to chemical changes in the fat of the cheese. *Journal of Dairy Science* 52, 598.
- Olivecrona, T. y Bengtsson-Olivecrona, G. (1991) Indigenous enzymes in milk: Lipase, *Food Enzymology*, vol.1, P. F. Fox (ed.), Elsevier Applied Science, London.

- Olivecrona, T., Vilaró, S. y Bengtsson-Olivecrona, G. (1992). Indigenous enzymes in milk. II. Lipases in milk. *Advanced Dairy Chemistry, 1-Proteins*. P. F. Fox (ed.), Elsevier Applied Science, London.
- Ordóñez, J. A. y Burgos, J. (1980). Free amino acids of Manchego cheese ripened in olive oil. *Milchwissenschaft* 35, 69-71.
- Ordóñez, J. A., Barneto, R. y Mármol, M. P. (1978b). Identificación de la flora que participa en la maduración del queso Manchego. *Anales de Bromatología*, XXX-3-4, 361-373.
- Ordóñez, J. A., Barneto, R. y Ramos, M. (1978a). Studies on Manchego cheese ripened in olive oil. *Milchwissenschaft* 33, 609-612.
- Paquet, J. y Gripon, J. C. (1980). Intracellular peptide hydrolases of *Penicillium roqueforti*. *Milchwissenschaft* 35, 72.
- Parodi, P. W. (1979) Stereospecific distribution of fatty acids in bovine milk fat triglycerides. *Journal of Dairy Research* 46, 75-81.
- Pavía, M., Guamis, B. Y Ferragut, V. (1999a). Effects of ripening time and salting method on glycolysis in Manchego-type cheese. *Milchwissenschaft* 54, 379-381.
- Pavía, M., Guamis, B., Trujillo, A. J., Capellas, M. y Ferragut, V. (1999b). Changes in microstructural, textural and colour characteristics during ripening of Manchego-type cheese salted by brine vacuum impregnation. *International Dairy Journal* 9, 91-98.
- Pearce, K. N., Karahalios, D. y Friedman, M. (1988). Ninhydrin assay for proteolysis in cheese ripening. *Journal of Food Science* 53, 432-435, 438.
- Picón, A, Gaya, P., Medina, M. y Núñez, M. (1994). The effect of liposome encapsulation of chymosin derived by fermentation on Manchego cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 77, 16-23.

- Picón, A., Gaya, M., Medina, M. y Núñez, M. (1994). The effect of liposome-encapsulated cyprosin on Manchego cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 79, 1699-1705.
- Picón, A., Gaya, M., Medina, M. y Núñez, M. (1995). The effect of liposome-encapsulated *Bacillus subtilis* neutral proteinase on Manchego cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 78, 1238-1247.
- Pillay, V. T., Myhr, A. N. y Gray, J. I. (1980). Lipolysis in milk. I. Determination of free fatty acids and threshold values for lipolyzed flavour detection. *Journal of Dairy Science* 48, 1213-1218.
- Polo, C., Ramos, M. y Sánchez, R. (1985). Free amino acids by high performance liquid chromatography and peptides by gel electrophoresis in Mahón cheese during ripening. *Food Chemistry* 16, 85-96.
- Poveda, J. M., Cabezas, L. y García, A. (1999a). Changes in physicochemical properties and proteolysis in Manchego cheese preserved in olive oil. *Milchwissenschaft* 54, 252-255.
- Poveda, J. M., Pérez-Coello, M. S. y Cabezas, L. (1999b). Evolution of the free fatty acid fraction in Manchego cheese during ripening. *Milchwissenschaft* 54, 685-687.
- Poveda, J. M., Pérez-Coello, M. S. y Cabezas, L. (2000). Seasonal variations in the free fatty acid composition of Manchego cheese and changes during ripening. *European Food Research and Technology* 210, 314-317.
- Puchades, R., Lemieux, L. y Simard, R. E. (1989). Evolution of free amino acids during ripening of Cheddar cheese containing added lactobacilli strains. *Journal of Food Science* 54, 885-888, 946.
- Ramos, M. (1976). Aplicación del método inmunológico a la detección de leche de vaca en queso Manchego. *Revista Española de Lechería* 101, 147-154.

- Ramos, M. y Juárez, M. (1986). Chromatographic, electrophoretic and immunological methods for detecting mixtures of milk from different species. *Bulletin International Dairy Federation* 202, 175-190.
- Ramos, M. y Martínez-Castro, I. (1976). Etude de la protéolyse du fromage type "Manchego" au cours de l'affinage. *Le Lait* 553-554, 164-176.
- Ramos, M., Barneto, R. y Ordóñez, J. A. (1981). Evaluation of a specific starter for Manchego cheese production. *Milchwissenschaft* 36, 528-531.
- Ramos, M., Cáceres, I., Polo, C., Alonso, L. y Juárez, M. (1987). Effect of freezing on soluble nitrogen fraction of Cabrales cheese. *Food Chemistry* 24, 271-278.
- Ramos, M., Martínez-Castro, I. y Juárez, M. (1976). Detection of cow's milk in Manchego cheese. *Journal of Dairy Science* 60, 870-877.
- Recio, I., De Frutos, M., Olano, A. y Ramos, M. (1996b). Protein changes in stored ultra-high-temperature-treated milks studied by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 3955-3959.
- Recio, I., López-Fandiño, R., Olano, A., Olieman, C. y Ramos, M. (1996a). Study of the formation of caseinomacropeptides in stored ultra-high-temperature-treated milk by capillary electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 3845-3848.
- Robinson, R. K. (1979). A method for the objective assessment of cheese flavour. *Milk industry* 81, 34-35.
- Rodríguez, E., Gaya, P., Núñez, M. y Medina, M. (1998). Inhibitory activity of a nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewes milk Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology* 39, 129-132.
- Román Piñana, M. (1975). Etude de la flore microbienne du fromage espagnol "Manchego". *Le Lait* 547, 401-413.

- Samples, D. R., Richter, R. L. y Dill, C. W. (1984). Measuring proteolysis in Cheddar cheese slurries, comparison of Hull and trinitrobenzene sulfonic acid procedures. *Journal of Dairy Science* 67, 60-63.
- Scott, R. (1981). *Cheesemaking practice*. Elsevier Applied Science Publishers, London.
- Shalabi, S. I. y Fox, P. F. (1987). Electrophoretic analysis of cheese: comparison of methods. *Irish Journal of Food Science and Technology* 11, 135-151.
- Singh, T. K., Fox, P. F., Hojrup, P. y Healy, A. (1994). A scheme for fractionation of cheese nitrogen and identification of principal peptides. *International Dairy Journal* 4, 111-122.
- Sorhaug, T. y Stepaniak, L. (1977). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology* 8, 35-41.
- Sousa y Malcata, (1997). Ripening of ovine milk cheeses: effects of plant rennet, pasteurization and addition of stater on lipolysis. *Food Chemistry* 59, 427-432.
- Thomas, T. D. y Crow, V. L. (1983). Mechanism of D(-)-lactic formation in Cheddar cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 18, 131-141.
- Tuomala, T. y Kallio, H. (1996). Identification of free fatty acids and some other volatiles flavour compounds from Swiss cheese using on-line supercritical fluid extraction-gas chromatography. *Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung Forschung* 203, 236-240.
- Turner, K. W. y Thomas, T. D. (1980). Lactose fermentation in Cheddar cheese and the effect of salt. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 18, 117-123.
- Turner, K. W., Morris, H. A, y Martley, F. G. (1983). Swiss-type cheese. II. The role of thermophilic lactobacilli in sugar fermentation, *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 18, 117.

- Uceda, R, Guillén, A. M., Gaya, P., Medina, M. y Núñez, M. (1994). Chemical and rheological characteristics of Manchego cheese manufactured from ewe raw milk preserved by activation of the lactoperoxidase system. *Milchwissenschaft* 49, 494-499.
- Urbach, G. (1993). Relations between cheese flavour and chemical composition. *International Dairy Journal* 3, 389-422.
- Vakaleris, B. y Price, W. (1959). A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 42, 264-276.
- Van der Berg, G. y de Koning, P. J. (1990). Gouda cheese-making with purified calf chymosin and microbiologically produced chymosin. *Netherland Milk Dairy Journal* 44, 189-205.
- Visser, F. M. W. y Groot-Mostert, A. E. A. (1977). Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 4. Protein breakdown: a gel electrophoretic study. *New Zealand Milk Dairy Journal* 31, 247.
- Visser, S., Slangen, K. J. y Hup, G. (1975). Some bitter peptides from rennet-treated casein. A method for their purification, utilizing chromatographic separation on silica gel. *Netherland Milk Dairy Journal* 29, 319-334.
- Visser, S., Slangen, K. J., Hup, G. y Stadhouders, J. (1983). Bitter flavour in cheese. 3. Comparative gel-chromatographic analysis of hydrophobic peptide fractions from twelve Gouda-type cheeses and identification of bitter peptides isolated from a cheese made with *Streptococcus cremoris* strain HP. *Netherland Milk Dairy Journal* 37, 181-192.
- Vreeman, M. J. y Van Riel, J. A. M. (1990). The large-scale isolation of α_{s2} -casein from bovine casein. *Netherland Milk Dairy Journal* 44, 43-48.
- Weinstein, M. J. y Doolittle, R. F. (1972). Differential specificities of thrombin, plasmin and trypsin with regard to synthetic and natural substrates and inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 258, 577.

- Wijesundera, C., Drury, L., Muthuku-Marappan, K., Gunasekaran, S. y Everett, D. W. (1998). Flavour development and distribution of fat globule size and shape in Cheddar-type cheeses made from skim milk homogenised with AMF or its fractions. *Australian Journal of Dairy Technology* 53, 107.
- Wilkinson, M. G., Guinee, T. P., O'Callaghan, D. M. y Fox, P. F. (1992). Effect of commercial enzymes on proteolysis and ripening in Cheddar cheese. *Lait* 72, 449-459.
- Witorama, I. P. y Ney, K. H. (1973). Isolation and identification of aliphatic amides in Cheddar, Emmental, Manchego and German blue cheeses. *Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung Forschung* 203, 230-235.
- Woo, A. H. y Lindsay, R. C. (1982). Rapid method for quantitative individual free fatty acids in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 65, 1102-1109.
- Wood, A. F., Aston, J. V. y Douglas, G. K. (1985). The determination of free amino acids in cheese by capillary column gas-liquid chromatography. *Australian Journal of Dairy Technology* 40, 166-169.
- Worstorff, H., Heeschen, W. y Tolle, A. (1972). Free fatty acids in milk in relation to flow and conditions in milking machines. *Milchwissenschaft* 27, 447-480.
- Young, P. M., Astephen, N. E. y Wheat, T. E. (1992). Effects of pH and buffer composition on peptide separations by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Liquid Chromatography-Gas Chromatography* 10, 26-30.
- Zarpoutis, I. V, McSweeney, P. L. H., Beechinor, J. y Fox, P. F. (1996). Proteolysis in the Irish farmhouse blue cheese Chetwynd. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 35, 25-36.

1.6. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

En la Unión Europea, la proporción de leche que tiene como destino principal la elaboración de queso, está en torno al 95% tanto en la de oveja como en la de cabra. En España, el 27% de la leche de oveja se produce en Castilla-La Mancha, la cual es utilizada en la fabricación de queso Manchego. El queso Manchego, constituye la variedad más representativa de los producidos y elaborados a partir de leche de oveja, así como una de las 12 variedades protegidas por la Denominación de Origen (Anónimo 1996a, b) de las 84 oficialmente reconocidas. Más de la mitad del queso producido con Denominación Origen corresponde al queso Manchego con una producción de 2.002.181 piezas en el año 1999.

Los primeros trabajos realizados en este Departamento y que culminaron con una Tesis Doctoral, leída en 1996, se centraron en:

-Conocer la evolución exacta de diferentes parámetros de composición físico-química y de los indicadores de la proteólisis primaria y secundaria a lo largo de la maduración (desde los 15 días hasta los 150 días). Para ello se elaboraron quesos a escala semiindustrial siguiendo la tecnología del Manchego.

-Diseñar un modelo matemático para determinar el tiempo de maduración de los quesos del mercado.

-Aislar e identificar las bacterias lácticas presentes en diferentes quesos Manchegos comerciales, estudiándose las propiedades de interés tecnológico (actividad acidificante y actividad proteolítica) y se propuso un cultivo iniciador o *starter* que podría ser utilizado para fabricar el queso Manchego.

La **Memoria** que se presenta es una continuación de los aspectos comentados anteriormente sobre el queso Manchego, ampliando los conocimientos del mismo, con el objetivo de mejorar su calidad y de que este tipo de queso pueda competir en el mercado Europeo con otras variedades de quesos más conocidos internacionalmente.

El trabajo se estructuró en tres partes:

-Elaboración de dos lotes de quesos siguiendo la tecnología del Manchego en dos estaciones distintas del año (invierno y primavera).

-Mejora de la ecuación predictiva propuesta por García-Ruiz *et al.* (1998) para determinar el tiempo de maduración de quesos Manchegos del mercado, utilizando los datos físico-químicos y de proteolisis de estos lotes de quesos Manchegos elaborados en distintas estaciones.

-Estudio de la lipólisis experimentada por los lotes quesos fabricados en distintas estaciones y a lo largo de la maduración.

-Estudio de la influencia de la utilización de diferentes *starters* sobre la proteólisis, características físico-químicas y sensoriales de quesos Manchegos fabricados a escala semiindustrial.

CAPÍTULO 2

INFLUENCIA DE LA ÉPOCA DE ELABORACIÓN EN LA PREDICCIÓN DEL TIEMPO DE MADURACIÓN DEL QUESO MANCHEGO

2.1. INTRODUCCIÓN: ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Para estudiar la relación entre dos bloques de parámetros medidos para un número determinado de muestras se pueden emplear diferentes modelos estadísticos, tales como MLR (Multiple Linear Regression), PCR (Principal Component Regression) y PLS (Partial Least Squares). Estos modelos estadísticos han sido utilizados ampliamente para relacionar la composición física o química con características sensoriales en modelos de calibración (Martens y Naes, 1993) y en la determinación del porcentaje de composición de mezclas de leche (Molina y Martín-Álvarez, 1996).

Santa-María *et al.* (1986) utilizaron el análisis discriminante de diferentes valores de parámetros proteolíticos de muestras de queso “tipo Manchego” para determinar el grado de maduración de los quesos.

Franco *et al.* (1992) también emplearon ese mismo método estadístico para caracterizar quesos comerciales “tipo Manchego” según las mezclas de leche utilizadas en su fabricación.

Actualmente no es un requisito indispensable indicar en las etiquetas de los quesos de D. O. Manchego el tiempo de maduración que tienen antes de salir al mercado. El queso Manchego se comercializa desde los 60 días de maduración (tiempo legal mínimo requerido), pudiendo encontrar en el mercado quesos de hasta 12 meses de curación o incluso más. Esta gran variabilidad en el tiempo de curación del queso Manchego da lugar a que los quesos tengan distintos precios, debido al hecho de que tener que madurar el queso encarece el producto. Por lo tanto, sería interesante conocer el tiempo de maduración de los quesos que van a comercializarse, sobre todo desde el punto de vista económico.

De esta forma se realizó un estudio en este Departamento con el propósito de desarrollar una ecuación o modelo matemático que permitiera calcular el tiempo de maduración de quesos Manchegos comerciales. Ase elaboró un lote de 21 quesos Manchegos y se maduraron hasta los 150 días. Estos quesos fueron fabricados en otoño.

Se analizaron en distintas fechas de maduración y a los resultados obtenidos para las variables de composición y de proteolisis se aplicaron diferentes modelos estadísticos de análisis multivariante (MLR, PCR y PLS). El método de PLS resultó ser el mejor para predecir el tiempo de maduración de estos quesos (García-Ruiz *et al.*, 1998). Con este método se obtuvo un RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction, error medio de predicción) de 10,3 días, con lo cual, las diferencias encontradas entre los tiempos reales y los tiempos predichos con la ecuación obtenida fueron en la mayoría de los casos inferiores a 10 días.

Sin embargo, este estudio se consideró como un ensayo preliminar, ya que para asegurar la utilidad de esta ecuación sería necesario realizar la predicción con un mayor número de muestras, incluyendo quesos elaborados en otras épocas del año, para así obtener unas conclusiones más consistentes.

Así, este trabajo consistió en elaborar dos nuevos lotes de quesos Manchegos fabricados en la misma industria y en las mismas condiciones que los del trabajo citado anteriormente, estudiar sus características físico-químicas y de proteolisis, con el **objetivo** de obtener una nueva ecuación o modelo de predicción del tiempo de maduración de los mismos.

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1. Material experimental

Como material experimental se emplearon dos lotes de quesos elaborados a escala semiindustrial en dos épocas del año (invierno y primavera), siguiendo la tecnología del Manchego. En cada lote se fabricaron 21 quesos de un peso aproximado de 1,5 Kg. Los quesos recién elaborados fueron transportados en refrigeración hasta el laboratorio, donde se almacenaron en una cámara de maduración a 14 °C y con una humedad relativa del 80%. Los quesos fueron madurados durante 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 días, y para cada período de maduración se destinaron tres quesos individuales, denominados A, B y C, con lo cual, el número total de quesos fue de 42.

Para efectuar los análisis se cortó una muestra en forma de cuña de unos 250 g de cada uno de los tres quesos correspondientes a cada tiempo de maduración. Cada una de las muestras se trituraron con una picadora eléctrica y se homogeneizaron, siendo congeladas a -20 °C hasta efectuar los análisis.

2.2.2. Análisis físico-químicos

Se realizaron los análisis de la leche de partida y de las muestras de queso en las distintas fechas de maduración consideradas. En la leche se determinó el extracto seco, el pH, la acidez total, el nitrógeno total y la grasa. En las muestras de queso se determinó la Aw, el pH, el extracto seco, el contenido en cloruros y el nitrógeno y proteína totales.

2.2.2.1. Determinación de la actividad del agua (Aw)

La medición de la Aw se realizó con un higrómetro de rocío Decagon Devices CX-2. Este aparato consta de una cámara con espejo y un ventilador que enfría el aire y lo hace circular por la superficie de la muestra. De esta forma determina la temperatura exacta de condensación del vapor de agua, que está directamente relacionada con la Aw de la muestra. El ventilador, al enfriar el aire, permite la condensación de éste, depositándose

sobre el espejo. Un microprocesador controla la formación del condensado y mide la temperatura exacta de condensación, realizando medidas en el intervalo de 0,03 a 1,00 unidades, con una precisión de 0,003 unidades.

El procedimiento para efectuar las medidas consiste en colocar en cápsulas de plástico las muestras de queso homogeneizadas, formando una fina capa que cubre totalmente el fondo. Dichas cápsulas se tapan y se dejan a temperatura ambiente. Posteriormente se colocan destapadas una a una en la cámara de medición del higrómetro para la lectura digital de la Aw y de la temperatura. Tanto la Aw como la temperatura son visualizadas en una pantalla de cristal líquido.

2.2.2.2. Determinación del pH

El valor del pH se determinó con un pH-metro Crison 2002, mediante lectura directa, introduciendo en el caso de la leche un electrodo para líquidos. Para las muestras de queso se utilizó un electrodo de penetración Ingold en la muestra una vez triturada y homogeneizada.

2.2.2.3. Determinación del extracto seco

Se realizó desecando una cantidad conocida de leche a una temperatura de 102 ± 2 °C hasta peso constante según la Norma de la Federación Internacional de Lechería (FIL 4A 1982), por desecación de la muestra en una estufa de aire caliente a 110 °C hasta peso constante.

2.2.2.4. Determinación de cloruros

El análisis de cloruros se llevó a cabo siguiendo el método de la AOAC (1995), basado en el método de Volhard modificado por Kosikowski (1982), en el cual, después de la mineralización de la muestra con ácido nítrico y la oxidación simultánea con permanganato potásico, se adicionan 2 mL de nitrobencono para aglomerar el precipitado

y obtener una solución limpia. Finalmente se realiza una valoración con sulfocianuro potásico 0,1 N, utilizando como indicador sulfato amónico-férrico en solución saturada.

2.2.2.5. Determinación de nitrógeno y proteína totales

El contenido en nitrógeno total se determinó por el método de Kjeldahl (AOAC 1995). Para ello se utilizó un digestor Büchi 426 y un aparato de destilación Büchi 316.

El método consiste en la transformación del nitrógeno presente en la muestra en sulfato amónico, por ataque con ácido sulfúrico concentrado a ebullición, en presencia del catalizador K-203 (sulfato sódico y sulfato de cobre). A continuación la muestra se destila en medio alcalino recogiendo el destilado sobre ácido clorhídrico 0,1 N. El exceso de ácido se valora con hidróxido sódico 0,1 N, utilizando como indicador rojo de metilo.

El valor de nitrógeno total obtenido se multiplicó por un factor de 6,38 para obtener el contenido en proteína total.

2.2.2.6. Determinación de grasa

Se llevó a cabo mediante el método de Heiss (1961), adaptación del método de Gerber. Consiste en la liberación de la grasa por disolución de las sustancias proteicas, separación de la grasa por centrifugación y posterior medida volumétrica de ésta.

2.2.3. Estudio de la proteólisis

2.2.3.1. Electroforesis en gel de urea-poliacrilamida

-Preparación de las muestras de caseína

A 10 g de queso se añadieron 16 mL de agua destilada y se homogeneizaron con un ultraturax. Se añadió ácido acético al 10% (V/V) hasta pH 4,6 comprobado con un pH-metro Crison 2002. Se dejó reposar 2 horas a temperatura ambiente y a continuación se

centrifugó a 3000 xg durante 20 minutos. El precipitado obtenido contiene las caseínas del queso. Éste se lavó tres veces con alícuotas de 20 mL de tampón acético 4%-acetato sódico 0,4 M (mezcla 1:1, preparado en el momento antes de utilizarlo). Se centrifugó cada vez a 3000 xg durante 10 min a 5 °C. Por último, se realizaron dos lavados con una mezcla al 50% de diclorometano y tampón acético-acetato, centrifugando en las mismas condiciones anteriores. Las caseínas obtenidas se secaron entre papeles de filtro y se congelaron posteriormente a -20 °C.

Para realizar la electroforesis se pesaron 10 mg de caseína y se disolvieron en 1 mL de urea 7 M, según el método de Assenat (1967), agitando hasta su completa disolución.

-Reactivos

- Solución A

Ácido clorhídrico 1 N.....48,0 mL
Tris-hidroximetil-aminometano (TRIS).....36,3 g
N,N'-tetrametiléndiamina (TEMED).....0,46 mL
Agua destilada.....hasta 100 mL

- Solución B

Acrilamida.....30,0 g
N,N'-metilénbisacrilamida (BIS).....0,8 g
Agua destilada.....hasta 100 mL

- Tampón de electrodos (pH= 8,3)

Tris-hidroximetil-aminometano.....0,60 g
Glicina.....2,88 g
Agua destilada.....hasta 1.000 mL

- Solución de persulfato amónico al 0,56%

- Azul de bromofenol al 0,05%

- Urea 7 M

- Ácido tricloroacético al 12%

- Solución de revelado

Azul de Coomassie R 250.....1 g
Etanol200 mL
Ácido acético40 mL
Agua destilada hasta 400 mL

- Solución diluyente

Etanol400 mL
Ácido acético50 mL
Glicerol25 mL
Agua destiladahasta 1.000 mL

- Solución decolorante

Etanol400 mL
Ácido acético.....100 mL
Glicerol50 mL
Agua destilada hasta 2.000 mL

-Preparación del gel

La concentración de acrilamida y de agente de entrecruzamiento fueron definidas por la terminología de Hjerten, siendo:

$$\%T = (g \text{ de acrilamida} + g \text{ de bisacrilamida}) / 100 \text{ mL de solución}$$

$$\%C = (g \text{ de bisacrilamida} \times 100) / \%T$$

La electroforesis de las caseínas se realizó según el método descrito por Ramos *et al.* (1977).

Las concentraciones de acrilamida utilizadas fueron:

T= 7,7%

C= 2,6%,

añadiéndose un 28,75% de urea.

La separación electroforética se llevó a cabo en una cubeta modelo Protean II Xi de 20 cm de Biorad, que permite la aplicación de 14 muestras. La cubeta de electroforesis estuvo conectada a un sistema de refrigeración modelo CH-5/PC-5 de Techne, a 13 °C, para evitar que el calor producido por el paso de la corriente eléctrica originase distorsión en las bandas electroforéticas.

El procedimiento seguido fue el siguiente:

Se mezclaron 2,5 mL de la solución A con 5 mL de la solución B y 5,75 g de urea. Se añadió agua hasta un volumen final de 17,5 mL, se agitó y se desaireó. Se añadieron 2,5 mL de persulfato amónico al 0,56%. La mezcla se depositó entre dos placas de vidrio de 20 x 20 cm, que se fijaron a la cubeta de electroforesis.

-Electroforesis

Se aplicó en cada pocillo una pequeña cantidad de tampón de los electrodos y a continuación se introdujeron 15 µL de la muestra preparada y 2 µL de azul de bromofenol al 0,05% con objeto de observar el frente, y se completó de nuevo cada pocillo con tampón de los electrodos.

A continuación se conectó la fuente de alimentación Isco (mod. 452) aplicando un campo de 30 mA durante media hora para que las muestras penetrasen en el gel y después se aplicó 60 mA durante aproximadamente 6 horas, hasta que el frente marcado por el azul de bromofenol estuvo situado a 0,5 cm del extremo inferior de la placa.

Una vez finalizado el ensayo, se introdujo el gel en ácido tricloroacético al 12% durante 1 hora para evitar desplazamientos posteriores de las bandas separadas.

Posteriormente, el gel se introdujo en una solución de glicerol al 20% con el fin de prevenir la posible rotura del mismo por resquebrajamiento.

-Tinción del gel

La solución colorante final se preparó mezclando un volumen de la solución de revelado con 19 volúmenes de la diluyente.

El gel permaneció en la solución colorante durante una noche en agitación, utilizando un agitador de balanceo SBS AB-2.

-Decoloración del gel

Se decoloró el gel manteniéndolo en 250 mL de solución decolorante en el agitador de balanceo, hasta que las bandas permanecieron bien teñidas sobre el fondo claro.

-Secado del gel

El gel se colocó entre dos hojas de papel celofán empapadas en agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente.

2.2.3.2. Fracciones nitrogenadas

-Fracción de nitrógeno soluble en agua

La fracción de nitrógeno soluble en agua está formada por aquellos péptidos y aminoácidos originados durante la maduración del queso al hidrolizarse las caseínas.

El procedimiento de análisis está basado en el método de Kuchroo y Fox (1982). Se homogeneizaron 10 g de queso con 50 mL de agua destilada mediante un ultraturax. A continuación la muestra se mantuvo en un baño de agua a 40 °C durante 30 min, centrifugándose a 3000 xg durante 30 min a 20 °C. Se enfrió con hielo durante media hora y se filtró a través de papel Whatman n° 40. Se utilizó una alícuota de 2 mL para la determinación del nitrógeno según la técnica Kjeldahl (AOAC, 1995).

-Fracción de nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5%

Esta fracción está formada por pequeños péptidos y aminoácidos de peso molecular menor de 600 daltons. El método seguido para su determinación fue el de Bütikofer *et al.* (1993) y consiste en:

A una alícuota de 20 mL de filtrado del nitrógeno soluble en agua, se añadieron 20 mL de una mezcla a partes iguales de ácido fosfotúngstico al 10% y ácido sulfúrico al 25%, preparada inmediatamente antes de ser utilizada. Se dejó reposar durante 24 horas hasta que se produjo la precipitación. Después se filtró a través de papel de filtro Whatman n° 42, realizando el Kjeldahl en 5 mL de filtrado.

2.2.3.3. Determinación de tirosina y triptófano

La tirosina (tyr) y el triptófano (trp) se cuantificaron midiendo la absorbancia a 270 y 290 nm de longitud de onda, respectivamente, de una alícuota tomada de la fracción de nitrógeno soluble (Fernández-Salguero, 1982). Las concentraciones de tirosina y triptófano se calcularon a partir de las ecuaciones propuestas por Vakaleris y Price (1959):

$$C_{\text{tyr}} = (0,95 A_{270} - 1,31 A_{290}) \times 10^{-3}$$

$$C_{\text{trp}} = (0,307 A_{290} - 0,02 A_{270}) \times 10^{-3}$$

donde:

C_{tyr} y C_{trp} = moles de tirosina y triptófano por litro de extracto

A_{270} y A_{290} = absorbancia del extracto a 270 y 290 nm

2.2.4. Tratamiento estadístico

Para observar si existían diferencias entre los dos lotes de quesos fabricados y entre los distintos tiempos de maduración se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor a los datos de composición físico-química, utilizando el test de Student-Newman-Keuls (S-N-K).

También se utilizó, dentro de las técnicas de análisis multivariante, el Análisis Factorial en Componentes Principales, utilizando la matriz de correlaciones y con rotación “Varimax”.

Estos tratamientos estadísticos se realizaron usando el programa estadístico SPSS para Windows, Versión 9.0.1.

Los modelos de predicción del tiempo de maduración se obtuvieron mediante el Análisis de Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS), utilizando el programa Unscrambler 6.1.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Análisis físico-químicos

En la Tabla 2.1 se presentan los resultados de los análisis físico-químicos de las leches utilizadas en la elaboración de los dos lotes de quesos. Las mayores diferencias radicaron en los valores de pH y acidez, ES y proteína total. Se sabe que la composición de la leche varía estacionalmente, ya que depende de la alimentación del animal, de sus condiciones fisiológicas (estado de lactación, edad y variación genética) y del clima predominante.

Tabla 2.1: Análisis físico-químicos de las leches de INVIERNO y PRIMAVERA utilizadas en la elaboración de los quesos Manchegos.

| Leche | ES (%) | pH | Acidez (°Dornic) | NP (%ES) | Grasa(%) |
|-----------|--------|------|------------------|----------|----------|
| Invierno | 19,57 | 6,61 | 28 | 30,66 | 6,45 |
| Primavera | 17,20 | 6,09 | 33 | 35,22 | 6,30 |

En la Tabla 2.2 se muestran los resultados de los análisis físico-químicos de las muestras de quesos Manchegos (A, B y C) elaborados en dos estaciones: invierno y primavera y en la Tabla 2.3 se presentan la media de estos datos y la desviación estándar, así como los resultados del ANOVA de un factor, utilizando como factor, en primer lugar, la estación de fabricación, y en segundo lugar, el tiempo de maduración. En las Figuras 2.1 y 2.2 se representa gráficamente la evolución a lo largo de la maduración de los parámetros analizados en las muestras de quesos Manchegos elaborados en invierno y en primavera.

Tabla 2.2: Resultados de los análisis físico-químicos de los quesos Manchegos (A, B y C) elaborados en INVIERNO y PRIMAVERA.

| Tiempo (días) | Muestra | ES (%) | pH | Aw | Cloruros (%ES) | NP (%ES) | |
|------------------|-----------|--------|-------|------|-------------------|-------------|-------|
| 15 días | Invierno | A | 54,17 | 4,99 | 0,970 | 2,75 | 37,90 |
| | | B | 53,88 | 4,99 | 0,977 | 2,71 | 38,22 |
| | | C | 54,89 | 5,05 | 0,978 | 2,33 | 38,73 |
| | Primavera | A | 53,61 | 4,84 | 0,966 | 3,38 | 40,90 |
| | | B | 55,06 | 4,89 | 0,961 | 3,56 | 40,58 |
| | | C | 54,25 | 4,88 | 0,965 | 3,21 | 42,36 |
| 30 días | Invierno | A | 55,77 | 5,06 | 0,969 | 2,55 | 38,54 |
| | | B | 56,65 | 5,09 | 0,969 | 2,77 | 39,30 |
| | | C | 55,75 | 4,95 | 0,970 | 3,09 | 38,02 |
| | Primavera | A | 57,70 | 4,88 | 0,956 | 3,45 | 40,83 |
| | | B | 55,97 | 4,87 | 0,957 | 3,84 | 40,45 |
| | | C | 56,98 | 4,88 | 0,955 | 3,76 | 40,64 |
| 45 días | Invierno | A | 58,17 | 4,99 | 0,957 | 2,89 | 38,09 |
| | | B | 58,53 | 5,04 | 0,961 | 2,41 | 38,60 |
| | | C | 59,36 | 5,00 | 0,956 | 2,96 | 39,11 |
| | Primavera | A | 58,08 | 4,93 | 0,948 | 4,05 | 41,09 |
| | | B | 59,38 | 4,92 | 0,947 | 4,01 | 40,70 |
| | | C | 60,39 | 4,93 | 0,944 | 3,96 | 40,39 |
| 60 días | Invierno | A | 61,09 | 5,05 | 0,952 | 2,80 | 38,73 |
| | | B | 59,61 | 4,98 | 0,952 | 2,89 | 38,41 |
| | | C | 61,21 | 5,07 | 0,952 | 2,84 | 38,66 |
| | Primavera | A | 61,41 | 4,98 | 0,941 | 3,79 | 41,21 |
| | | B | 62,10 | 4,97 | 0,941 | 3,67 | 40,19 |
| | | C | 60,82 | 4,95 | 0,948 | 3,58 | 40,19 |
| 90 días | Invierno | A | 63,92 | 5,15 | 0,939 | 2,64 | 38,60 |
| | | B | 62,66 | 5,09 | 0,943 | 2,95 | 38,15 |
| | | C | 62,56 | 5,11 | 0,945 | 2,67 | 38,85 |
| | Primavera | A | 63,94 | 4,89 | 0,933 | 3,75 | 40,83 |
| | | B | 63,85 | 4,92 | 0,935 | 3,81 | 39,30 |
| | | C | 64,78 | 4,90 | 0,936 | 3,70 | 39,62 |
| 120 días | Invierno | A | 67,98 | 4,99 | 0,923 | 3,00 | 38,73 |
| | | B | 68,03 | 5,06 | 0,926 | 2,70 | 38,60 |
| | | C | 67,21 | 5,00 | 0,929 | 2,92 | 37,64 |
| | Primavera | A | 66,55 | 4,92 | 0,927 | 3,64 | 39,94 |
| | | B | 66,48 | 4,96 | 0,927 | 3,67 | 40,00 |
| | | C | 67,07 | 4,97 | 0,925 | 3,76 | 39,62 |
| 150 días | Invierno | A | 68,55 | 5,05 | 0,916 | 3,14 | 38,92 |
| | | B | 69,44 | 5,10 | 0,915 | 2,95 | 38,41 |
| | | C | 69,31 | 5,14 | 0,919 | 2,67 | 39,05 |
| | Primavera | A | 68,46 | 5,01 | 0,914 | 3,74 | 40,07 |
| | | B | 69,80 | 5,01 | 0,910 | 3,78 | 40,07 |
| | | C | 69,30 | 5,03 | 0,912 | 3,75 | 39,68 |

El extracto seco (ES) es uno de los parámetros físico-químicos que experimenta mayores variaciones durante el proceso de maduración. En este caso, los valores de ES aumentaron de forma regular durante la maduración, oscilando entre un 54,3% a los 15 días hasta alcanzar un valor de 69,1% al final de la maduración, para los dos lotes de quesos estudiados. Se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos para las distintas fechas de maduración en ambos lotes de quesos, según puso de manifiesto el test de comparación de medias (Tabla 2.3). No existieron diferencias entre los valores de ES entre las dos estaciones para todas las fechas de maduración, a excepción de las muestras de 120 días, que alcanzaron valores algo mayores para el lote de invierno. García-Ruiz (1996) obtuvo resultados similares para un lote de quesos Manchegos elaborados en otoño en las mismas condiciones y madurados durante los mismos períodos de tiempo. Los valores obtenidos en el presente estudio fueron ligeramente inferiores a los obtenidos en queso Manchego por Picón *et al.* (1995) y similares a los encontrados por Fernández-García *et al.* (1998) y Gómez *et al.* (1999) en queso Manchego.

En cuanto al pH, éste se mantuvo más o menos constante durante todo el período de maduración, mostrando oscilaciones en torno a 5,0 no significativas, para el lote de invierno, y alrededor de 4,9 para los quesos de primavera. En este segundo lote de quesos hubo diferencias entre los valores de pH para algunas fechas de maduración. En cuanto a las diferencias entre ambos lotes, éstas resultaron ser significativas, en general, para todas las fechas estudiadas, excepto para las muestras de 60 y 120 días. Los menores valores de pH obtenidos para los quesos del lote de primavera respecto al de invierno podrían ser debidos al menor valor de pH de la leche de partida. García-Ruiz *et al.* (1998) encontraron valores de pH similares para quesos Manchegos elaborados en otoño, madurados durante los mismos períodos de tiempo.

Macedo y Malcata, (1996) encontraron que existían diferencias significativas entre el pH de quesos Serra elaborados en Mayo, Noviembre y Febrero. Así, las muestras elaboradas en Mayo, mostraron valores de pH superiores a los obtenidos para los quesos elaborados en Noviembre y Febrero.

TABLA 2.3: Valores medios¹ y desviación estándar de los análisis físico-químicos de los quesos Manchegos elaborados en INVIERNO y PRIMAVERA.

| | Tiempo de maduración (días) | INVIERNO | PRIMAVERA | Diferencias entre estaciones de fabricación ² |
|----------------|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------|--|
| ES (%) | 15 | 54,31 ^a ± 0,52 | 54,31 ^a ± 0,73 | ns |
| | 30 | 56,06 ^b ± 0,51 | 56,88 ^b ± 0,87 | ns |
| | 45 | 58,69 ^c ± 0,61 | 59,28 ^c ± 1,16 | ns |
| | 60 | 60,64 ^d ± 0,89 | 61,44 ^d ± 0,64 | ns |
| | 90 | 63,05 ^e ± 0,76 | 64,19 ^e ± 0,51 | ns |
| | 120 | 67,74 ^f ± 0,46 | 66,70 ^f ± 0,32 | * |
| | 150 | 69,10 ^g ± 0,48 | 69,19 ^g ± 0,68 | ns |
| pH | 15 | 5,01 ± 0,03 | 4,87 ^a ± 0,03 | ** |
| | 30 | 5,03 ± 0,07 | 4,88 ^a ± 0,01 | * |
| | 45 | 5,01 ± 0,03 | 4,93 ^{b,c} ± 0,01 | ** |
| | 60 | 5,03 ± 0,05 | 4,97 ^d ± 0,02 | ns |
| | 90 | 5,12 ± 0,03 | 4,90 ^{a,b} ± 0,02 | ** |
| | 120 | 5,02 ± 0,04 | 4,95 ^{c,d} ± 0,03 | ns |
| | 150 | 5,10 ± 0,05 | 5,02 ^e ± 0,01 | * |
| Aw | 15 | 0,975 ^a ± 0,004 | 0,964 ^a ± 0,003 | * |
| | 30 | 0,969 ^b ± 0,001 | 0,956 ^b ± 0,001 | ** |
| | 45 | 0,958 ^c ± 0,003 | 0,946 ^c ± 0,002 | ** |
| | 60 | 0,952 ^d ± 0,000 | 0,943 ^d ± 0,004 | * |
| | 90 | 0,942 ^e ± 0,003 | 0,935 ^d ± 0,002 | * |
| | 120 | 0,926 ^f ± 0,003 | 0,926 ^e ± 0,001 | ns |
| | 150 | 0,917 ^g ± 0,002 | 0,912 ^f ± 0,002 | * |
| Proteína (%ES) | 15 | 38,28 ± 0,42 | 41,28 ± 0,95 | ** |
| | 30 | 38,60 ± 0,64 | 40,64 ± 0,19 | ** |
| | 45 | 38,60 ± 0,51 | 40,70 ± 0,35 | ** |
| | 60 | 38,60 ± 0,17 | 40,51 ± 0,59 | ** |
| | 90 | 38,54 ± 0,36 | 39,94 ± 0,81 | ns |
| | 120 | 38,34 ± 0,59 | 39,88 ± 0,21 | * |
| | 150 | 38,79 ± 0,34 | 39,94 ± 0,22 | ** |
| Cloruros (%ES) | 15 | 2,60 ± 0,23 | 3,38 ^a ± 0,18 | ** |
| | 30 | 2,80 ± 0,27 | 3,68 ^b ± 0,21 | * |
| | 45 | 2,75 ± 0,30 | 4,01 ^c ± 0,04 | ** |
| | 60 | 2,84 ± 0,04 | 3,68 ^b ± 0,11 | ** |
| | 90 | 2,75 ± 0,17 | 3,76 ^b ± 0,05 | ** |
| | 120 | 2,87 ± 0,15 | 3,68 ^b ± 0,06 | ** |
| | 150 | 2,92 ± 0,24 | 3,76 ^b ± 0,02 | ** |

¹: Cada valor corresponde a la media del análisis por duplicado, realizado a su vez en tres quesos independientes.

²: Significación estadística de la varianza; ns: no significativo; *: P<0,05; **: P<0,01.

a, b, c, d, e, f, g: Medias en la misma **columna** con superíndices distintos son significativamente diferentes entre sí según el test de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

Los valores de A_w disminuyeron como era de esperar a lo largo de la maduración para las dos estaciones de fabricación estudiadas. Esto es debido a la proteólisis que tiene lugar en los quesos durante la maduración, en la cual se produce la hidrólisis de los enlaces peptídicos, dando lugar a más grupos iónicos, que tienden a fijar agua libre (Lawrence *et al.* 1987). Estos valores de la A_w oscilaron entre 0,975 (a los 15 días) y 0,917 (a los 150 días) para el lote de quesos de invierno, y entre 0,964 (a los 15 días) y 0,912 (a los 150 días) para los quesos de primavera. Los valores fueron significativamente distintos para prácticamente todas las fechas en ambas estaciones de fabricación. Por estaciones, los valores de A_w fueron ligeramente superiores para los quesos de invierno, siendo estas diferencias significativas para todos los tiempos de maduración estudiados, excepto a los 120 días (ver Tabla 2.3). Fontecha *et al.* (1994) encontraron unos valores de A_w en queso Manchego de 0,972 a los 15 días y 0,944 a los 90 días, similares a los obtenidos en este trabajo para las muestras de queso de invierno del mismo tiempo de maduración. García-Ruiz *et al.* (1998) obtuvieron valores de A_w ligeramente superiores a los del presente estudio en quesos Manchegos madurados durante los mismos períodos de tiempo, elaborados en otoño.

La concentración de cloruros en los quesos del presente estudio se mantuvo más o menos constante durante todo el período de maduración, sin presentar diferencias significativas entre las distintas fechas, con unos valores promedio de 2,79 (% ES) para el lote de invierno, y de 3,71 (% ES) para los quesos de primavera. El contenido en cloruros significativamente mayor de las muestras de queso elaboradas en primavera es debido posiblemente, a un mayor tiempo de inmersión en salmuera o a la utilización de una salmuera de una concentración de NaCl más elevada en el caso de los quesos de este lote, ya que la elaboración fue realizada a escala semiindustrial y a que los quesos no fueron elaborados en la misma fecha.

El contenido en proteína total también fue constante durante el proceso de maduración. Los quesos de primavera presentaron unos contenidos medios de proteína significativamente superiores a los de invierno (40,41 frente a 38,54, respectivamente). Esto es debido a que la leche empleada en la elaboración de los quesos de primavera también presentó un mayor valor en NP que la de invierno (35,22% frente a 30,66%,

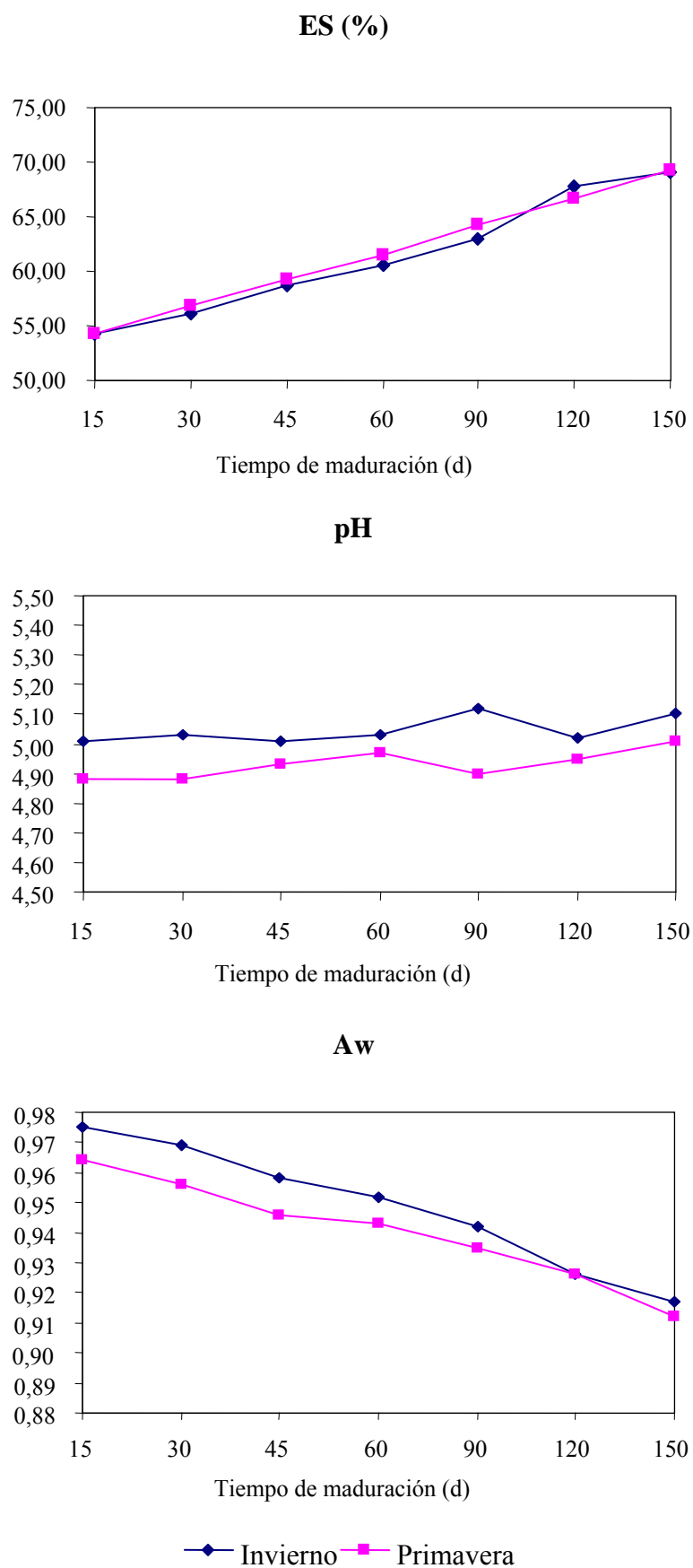


Figura 2.1: Evolución del ES, el pH y la Aw a lo largo de la maduración de los quesos Manchegos elaborados en **INVIERNO** y **PRIMAVERA**

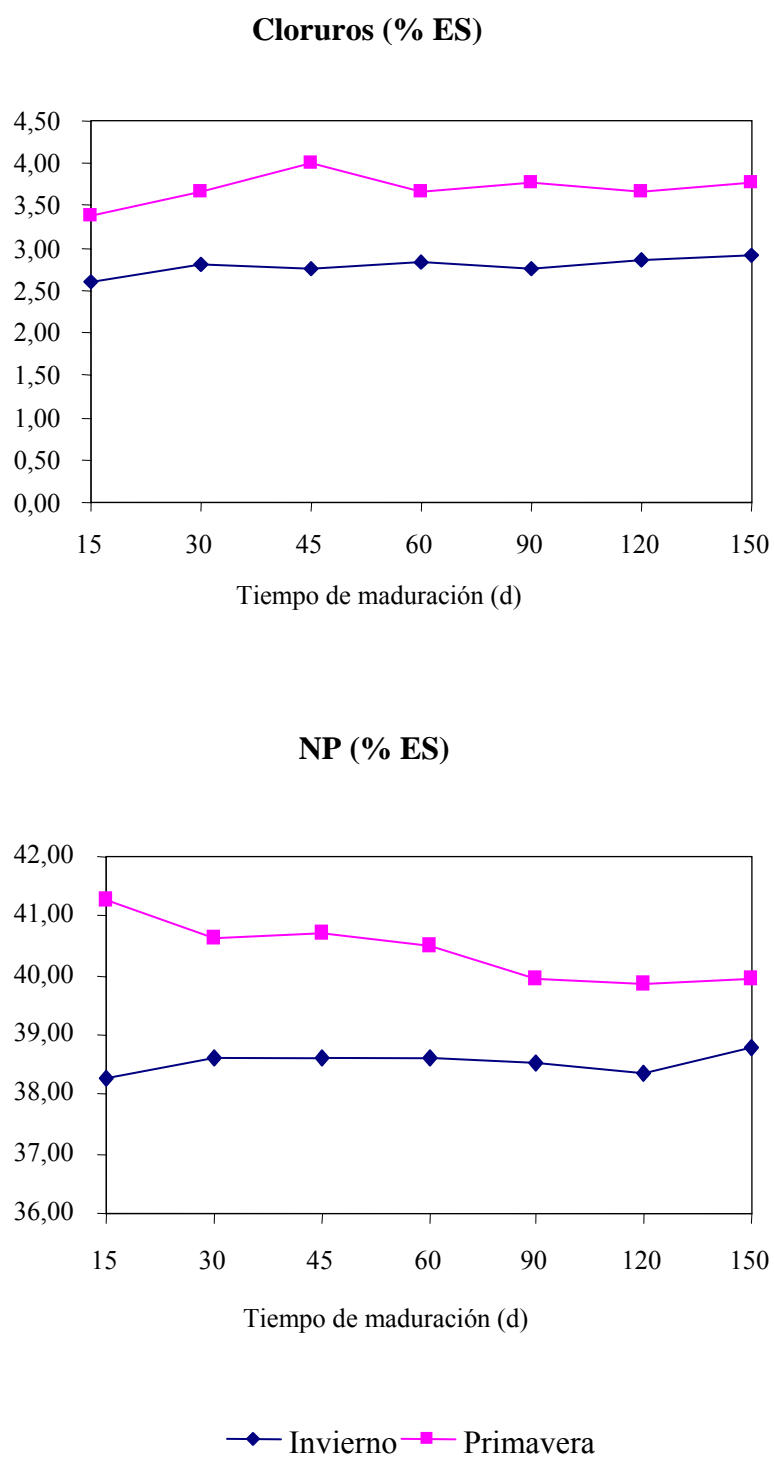


Figura 2.2: Evolución del contenido en Cloruros y del Nitrógeno Proteico a lo largo de la maduración de los quesos Manchegos elaborados en **INVIERNO** y **PRIMAVERA**

respectivamente). Es evidente que en la composición de la leche influyen numerosos factores, como son las condiciones climáticas y la alimentación. Por otro lado también varía en función del estado de lactación.

2.3.2. Proteolisis experimentada por las muestras de queso

Es conocido que la proteolisis es uno de los fenómenos más importantes que tienen lugar durante la maduración del queso y que sus productos de degradación, péptidos y aminoácidos, tienen una influencia decisiva en las características del mismo.

2.3.2.1. Electroforesis en gel de urea-poliacrilamida

La degradación enzimática de las caseínas durante el período de maduración de un queso juega un papel determinante en la liberación de compuestos que contribuyen a dar al queso su textura y su aroma característicos.

La velocidad de degradación de las caseínas a lo largo de la maduración depende en gran medida de las condiciones tecnológicas utilizadas durante la fabricación del queso, de la época de fabricación y de las condiciones de maduración (Collin et al., 1987).

Las Figuras 2.3 y 2.4 muestran los electroforegramas de las muestras de quesos Manchegos elaborados en invierno y en primavera, respectivamente. Se puede comprobar que en todas las muestras aparecieron las bandas características de las caseínas ovinas en el siguiente orden de mayor a menor movilidad electroforética: productos de degradación de la α -caseína, α -caseínas, β -caseínas y γ -caseínas.

A la vista de ambos electroforegramas se observa que en general, la proteolisis fue más intensa en los quesos elaborados en invierno donde se pueden observar una mayor intensidad de las bandas correspondientes a los productos de degradación de las α y β -caseínas que en los quesos elaborados en primavera. La proteolisis más lenta experimentada por los quesos del lote de primavera podría ser debido a la mayor concentración de sal de los mismos. Cabezas *et al.* (1993) encontraron, en un estudio

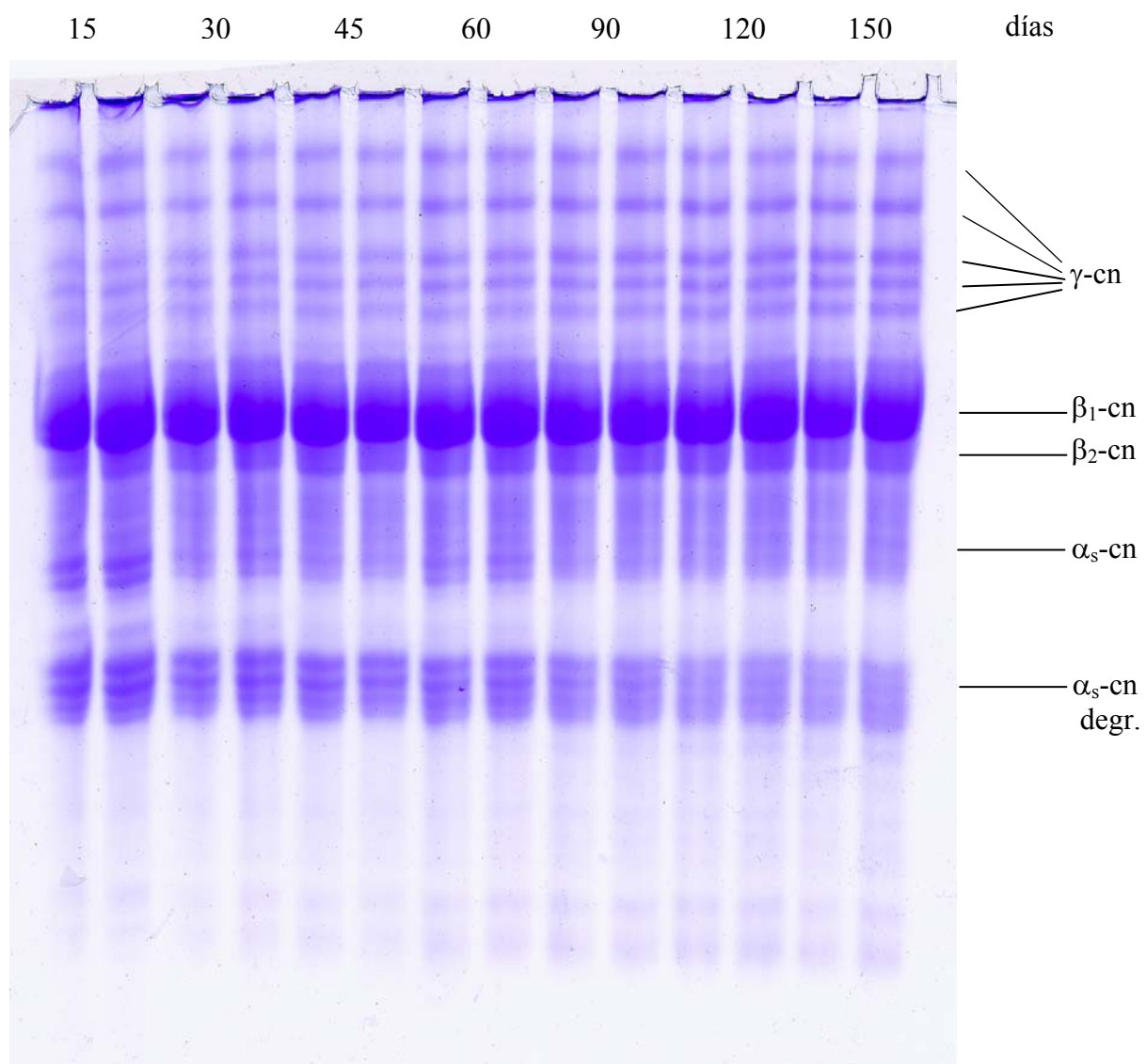


Figura 2.3: Electroforegramas de los quesos Manchegos elaborados en **INVIERNO**

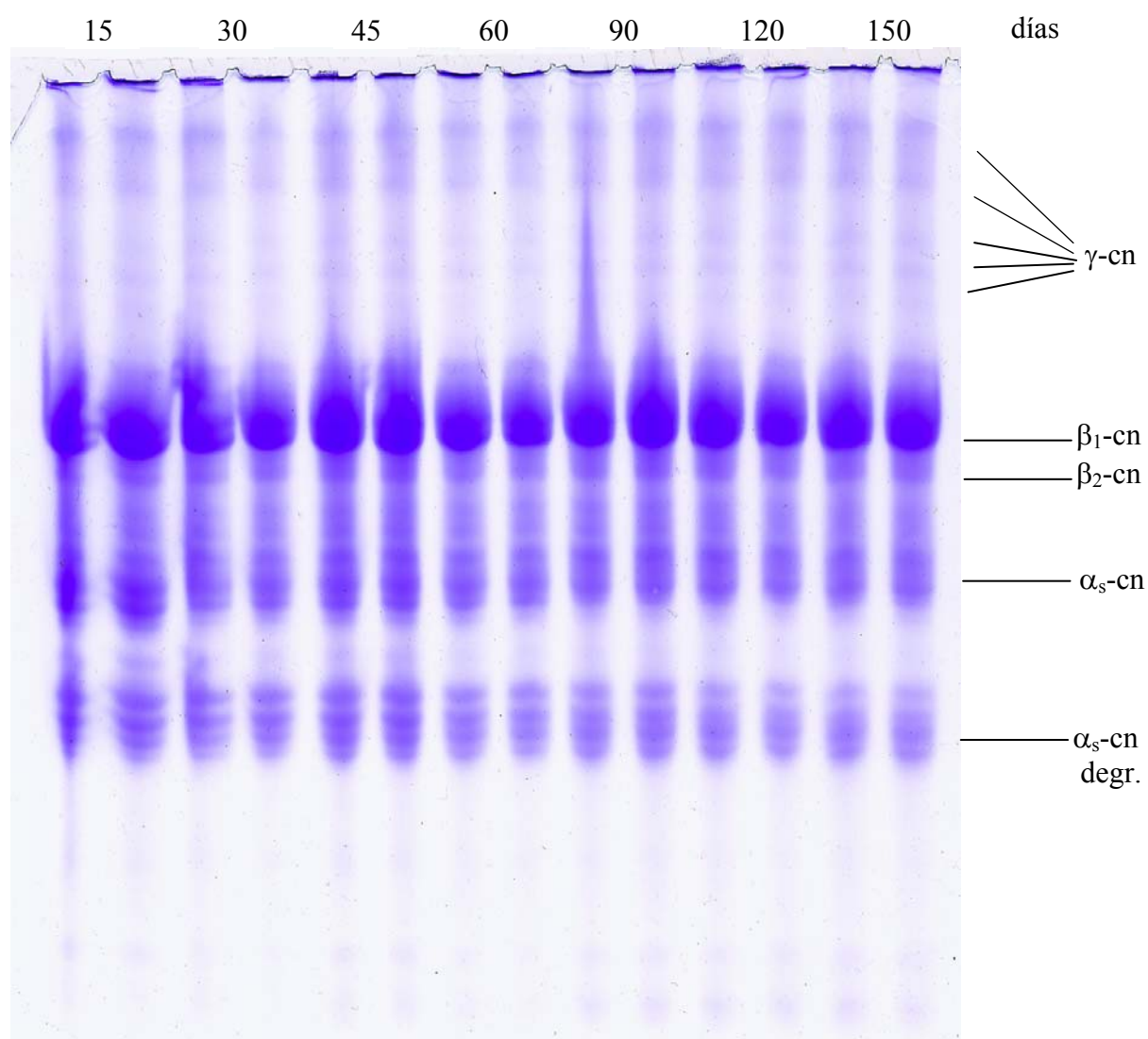


Figura 2.4: Electroforegramas de los quesos Manchegos elaborados en **PRIMAVERA**

realizado sobre el queso Gruyère de Comté, que después de 90 días de maduración y tras haber permanecido en salmuera durante 10 horas, la proteólisis experimentada por los quesos se vió reducida y fue similar a la alcanzada por las muestras de 45 días de maduración que no habían sido introducidas en salmuera.

Puesto que el objetivo de realizar la electroforesis de estas muestras de quesos fue el de comprobar que la proteólisis había transcurrido de una forma correcta y como los porcentajes de las distintas bandas electroforéticas no aparecieron en la ecuación de predicción del tiempo de maduración realizado previamente en quesos Manchegos elaborados en otoño (García-Ruiz *et al.*, 1998), no se realizó la cuantificación densitométrica de las bandas electroforéticas.

2.3.2.2. Fracciones nitrogenadas

Los productos originados en la hidrólisis primaria de las moléculas de caseína son posteriormente hidrolizados, dando lugar a fracciones nitrogenadas de menor peso molecular y aminoácidos. Este fenómeno fue descrito como proteólisis secundaria (Fox, 1989).

El estudio de la degradación proteolítica y la determinación fraccionada de grupos de componentes nitrogenados con propiedades y pesos moleculares similares sirven de base para establecer los índices clásicos de maduración y degradación del queso. El nitrógeno soluble (en % del NT) se ha considerado tradicionalmente como un índice de maduración, reflejando la extensión de la proteólisis.

El comportamiento general de todas las fracciones nitrogenadas solubles durante la maduración del queso se caracteriza por su tendencia al aumento como consecuencia de la acción conjunta de enzimas de distinta procedencia (microbianas, del cuajo y enzimas propias de la leche empleada en la fabricación del queso) sobre las caseínas.

En la Tabla 2.4 se presentan los valores de nitrógeno soluble en agua (NS) y nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico (N-PTA), expresados en peso en extracto seco, y de los valores de las relaciones NS/NT y N-PTA/NT de las muestras de queso elaboradas en invierno y primavera (quesos A, B y C). En la Tabla 2.5 se muestran los valores medios y desviación standard de estos datos, así como los resultados del test de comparación de medias por fechas de maduración y por estaciones de fabricación. La Figura 2.5 muestra la evolución experimentada por estas fracciones nitrogenadas, expresadas como porcentaje del NT, las cuales se consideran índices de la maduración.

Las concentraciones de nitrógeno soluble en agua (NS) y en nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico (N-PTA) aumentaron de forma progresiva con el tiempo de maduración en ambos lotes de quesos, tal y como era de esperar, mostrando diferencias significativas entre las distintas fechas estudiadas.

A la vista de los resultados del ANOVA considerando como factor la estación de fabricación, los valores de NS (expresados en %ES) fueron estadísticamente similares para ambos lotes de quesos en las primeras fechas de la maduración (hasta los 60 días) y empezaron a ser significativamente distintos a partir de los 3 meses hasta el final de la maduración, alcanzando niveles superiores las muestras de queso fabricadas en invierno. La relación NS/NT x 100 fue del 13,34% a los 15 días y 26,59% a los 150 días para las muestras del lote de invierno, mientras que para las de primavera este índice fue 10,06% y 21,30% a los 15 y 150 días, respectivamente. Nuevamente, el mayor contenido en sal de los quesos de primavera parece reflejarse en un menor grado de proteolisis experimentado por los mismos, ya que la sal afecta de forma negativa a la hidrólisis proteica (Schroeder *et al.*, 1988; Cabezas *et al.*, 1993).

García-Ruiz *et al.* (1998) obtuvieron para quesos Manchegos elaborados en otoño de forma similar a los de este estudio y madurados durante el mismo período de tiempo, que los valores de NS/NT aumentaron desde el 17,14% a los 15 días hasta un 28,87% a los 150 días.

Tabla 2.4: Fracciones nitrogenadas de los quesos Manchegos (A, B y C) elaborados en INVIERNO y PRIMAVERA.

| Tiempo (días) | Muestra | NS (%ES) | NS/NT x 100 | N-PTA (%ES) | N-PTA/NT x 100 |
|------------------|-----------|-------------|----------------|----------------|-------------------|
| 15 | Invierno | A | 0,83 | 13,97 | 0,06 |
| | | B | 0,80 | 13,36 | 0,07 |
| | | C | 0,77 | 12,69 | 0,05 |
| | Primavera | A | 0,47 | 7,33 | 0,02 |
| | | B | 0,64 | 10,06 | 0,02 |
| | | C | 0,85 | 12,80 | 0,00 |
| 30 | Invierno | A | 1,06 | 17,55 | 0,13 |
| | | B | 1,01 | 16,40 | 0,12 |
| | | C | 1,00 | 16,78 | 0,09 |
| | Primavera | A | 1,06 | 16,56 | 0,07 |
| | | B | 0,96 | 15,14 | 0,05 |
| | | C | 0,90 | 14,13 | 0,05 |
| 45 | Invierno | A | 1,10 | 26,80 | 0,15 |
| | | B | 1,26 | 20,83 | 0,12 |
| | | C | 1,26 | 18,43 | 0,10 |
| | Primavera | A | 1,10 | 17,08 | 0,09 |
| | | B | 1,01 | 15,83 | 0,07 |
| | | C | 1,03 | 16,27 | 0,15 |
| 60 | Invierno | A | 1,34 | 22,08 | 0,18 |
| | | B | 1,29 | 21,43 | 0,10 |
| | | C | 1,29 | 21,29 | 0,18 |
| | Primavera | A | 1,25 | 19,35 | 0,10 |
| | | B | 1,06 | 16,83 | 0,06 |
| | | C | 1,15 | 18,25 | 0,10 |
| 90 | Invierno | A | 1,45 | 23,97 | 0,31 |
| | | B | 1,58 | 26,42 | 0,27 |
| | | C | 1,61 | 26,44 | 0,29 |
| | Primavera | A | 1,25 | 19,53 | 0,08 |
| | | B | 1,28 | 20,78 | 0,09 |
| | | C | 1,34 | 21,58 | 0,14 |
| 120 | Invierno | A | 1,54 | 25,37 | 0,25 |
| | | B | 1,51 | 24,96 | 0,28 |
| | | C | 1,44 | 24,41 | 0,22 |
| | Primavera | A | 1,43 | 22,84 | 0,15 |
| | | B | 1,34 | 21,37 | 0,15 |
| | | C | 1,36 | 21,90 | 0,13 |
| 150 | Invierno | A | 1,58 | 25,90 | 0,33 |
| | | B | 1,63 | 27,08 | 0,30 |
| | | C | 1,64 | 26,80 | 0,35 |
| | Primavera | A | 1,37 | 21,82 | 0,13 |
| | | B | 1,30 | 20,70 | 0,14 |
| | | C | 1,33 | 21,38 | 0,16 |

Tabla 2.5: Valores medios¹ y desviación estándar de las fracciones nitrogenadas de los quesos Manchegos elaborados en **INVIERNO** y **PRIMAVERA**.

| | Tiempo de maduración (días) | INVIERNO | PRIMAVERA | Diferencias entre estaciones de fabricación ² |
|----------------|-----------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--|
| NS (%ES) | 15 | 0,80 ^a ± 0,03 | 0,65 ^a ± 0,19 | ns |
| | 30 | 1,02 ^b ± 0,03 | 0,97 ^b ± 0,08 | ns |
| | 45 | 1,21 ^c ± 0,09 | 1,05 ^b ± 0,05 | ns |
| | 60 | 1,31 ^d ± 0,03 | 1,15 ^{b,c} ± 0,10 | ns |
| | 90 | 1,55 ^e ± 0,09 | 1,29 ^{c,d} ± 0,05 | * |
| | 120 | 1,49 ^e ± 0,05 | 1,38 ^d ± 0,05 | * |
| | 150 | 1,62 ^e ± 0,03 | 1,33 ^{c,d} ± 0,04 | ** |
| N-PTA (%ES) | 15 | 0,06 ^a ± 0,01 | 0,01 ^a ± 0,01 | ** |
| | 30 | 0,11 ^b ± 0,11 | 0,06 ^b ± 0,01 | * |
| | 45 | 0,12 ^b ± 0,12 | 0,10 ^{b,c} ± 0,04 | ns |
| | 60 | 0,15 ^b ± 0,15 | 0,09 ^{b,c} ± 0,02 | ns |
| | 90 | 0,29 ^{c,d} ± 0,02 | 0,10 ^{b,c} ± 0,03 | ** |
| | 120 | 0,25 ^c ± 0,03 | 0,14 ^c ± 0,01 | ** |
| | 150 | 0,33 ^d ± 0,03 | 0,14 ^c ± 0,02 | ** |
| NS/NT x 100 | 15 | 13,34 ^a ± 0,64 | 10,06 ^a ± 2,74 | ns |
| | 30 | 19,91 ^b ± 0,56 | 15,28 ^b ± 1,22 | ns |
| | 45 | 22,02 ^c ± 4,31 | 16,39 ^b ± 0,63 | ns |
| | 60 | 21,60 ^c ± 0,42 | 18,14 ^b ± 1,26 | * |
| | 90 | 25,61 ^{c,d} ± 1,42 | 20,63 ^c ± 1,03 | ** |
| | 120 | 24,91 ^{c,d} ± 0,48 | 22,04 ^c ± 0,74 | ** |
| | 150 | 26,59 ^d ± 0,62 | 21,30 ^c ± 0,56 | ** |
| N-PTA/NT x 100 | 15 | 1,00 ^a ± 0,18 | 0,21 ^a ± 0,18 | ** |
| | 30 | 1,82 ^b ± 0,27 | 0,89 ^b ± 0,18 | ** |
| | 45 | 2,04 ^b ± 0,44 | 1,62 ^{b,c} ± 0,66 | ns |
| | 60 | 2,53 ^b ± 0,76 | 1,36 ^{b,c} ± 0,36 | ns |
| | 90 | 4,80 ^{c,d} ± 0,30 | 1,65 ^{b,c} ± 0,53 | ** |
| | 120 | 4,17 ^c ± 0,42 | 2,29 ^c ± 0,18 | ** |
| | 150 | 5,37 ^d ± 0,37 | 2,29 ^c ± 0,26 | ** |

¹: Cada valor corresponde a la media del análisis por duplicado, realizado a su vez en tres quesos independientes.

²: Significación estadística de la varianza; ns: no significativo; *: P<0,05; **: P<0,01.

^{a, b, c, d, e, f, g}: Medias en la misma **columna** con superíndices distintos son significativamente diferentes entre sí según el test de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

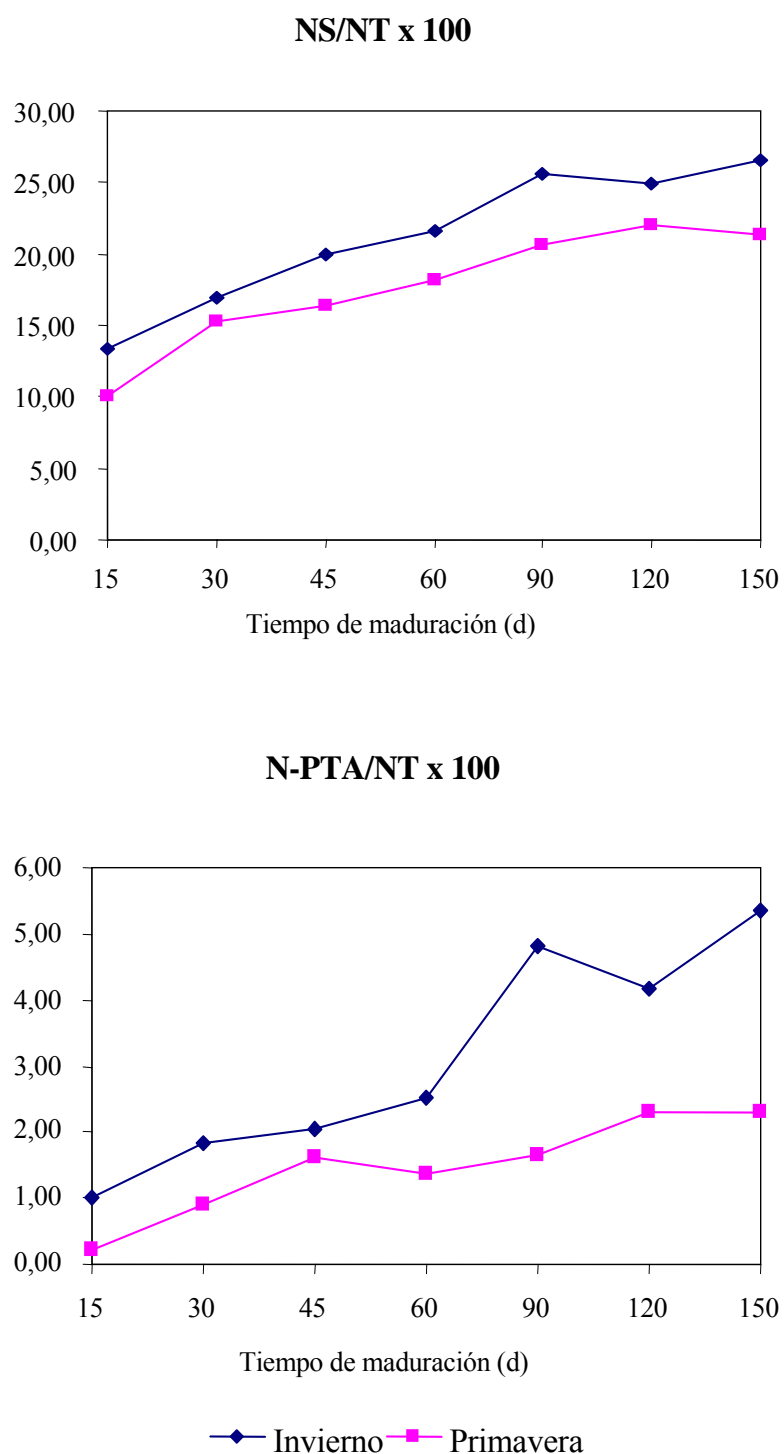


Figura 2.5: Evolución de los índices de maduración $NS/NT \times 100$ y $N-PTA/NT \times 100$ a lo largo de la maduración de los quesos Manchegos elaborados en **INVIERNO** y **PRIMAVERA**

En diferentes trabajos realizados por otros investigadores sobre la proteólisis secundaria experimentada en distintos quesos de oveja se obtuvo lo siguiente: Gaya *et al.* (1990) encontraron en queso Manchego de 4 meses de maduración elaborados con leche pasteurizada valores medios del NS de 6,74%. Uceda *et al.* (1994), encontraron un valor de NS soluble a pH 4,6 de 16,78 (% NT) para queso Manchego de 60 días de maduración. Guindeo *et al.* (1990) hallaron para queso Urbasa un porcentaje de NS/NT a los 90 días de maduración del 28,6%. Por último, Ibáñez *et al.* (1995) obtuvieron para queso Idiazábal valores de NS/NT de 8,38% y 16,84% a los 15 y 180 días, respectivamente.

La fracción de nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico, que contiene aminoácidos libres y péptidos de pequeño tamaño, es una fracción relevante para la intensidad del sabor del queso Manchego (Gaya *et al.*, 1990). Los valores de N-PTA fueron significativamente superiores para los quesos elaborados en invierno respecto a los de primavera durante todo el proceso de maduración, excepto a los 45 y 60 días.

De nuevo, la mayor concentración de sal de los quesos de primavera podría haber frenado la proteólisis secundaria experimentada por estas muestras.

García-Ruiz *et al.* (1998) obtuvieron para quesos Manchegos elaborados en otoño unos valores para la relación N-PTA/NT que oscilaron entre 1,54% a los 15 días y 3,90% a los 150 días.

Mohedano *et al.* (1998) obtuvieron en queso Manchego de los 60 días de maduración un valor de N-PTA de 8,20%, notablemente superior al obtenido en el presente estudio para las muestras con el mismo tiempo de maduración. Gómez *et al.* (1999) obtuvieron para el N-PTA (% NT) de queso Manchego elaborado con leche pasteurizada, unos resultados ligeramente inferiores a los de este estudio.

2.3.2.3. Contenido en tirosina y triptófano

La contribución de cada uno de los aminoácidos y su evolución a lo largo de la maduración de los quesos ha sido de gran interés por su influencia decisiva en la calidad organoléptica del producto. El catabolismo de los aminoácidos es el aspecto menos estudiado y caracterizado de la maduración del queso, y es muy probable que los productos del catabolismo de los aminoácidos sean los principales contribuyentes al sabor de muchas variedades de quesos.

En la Tabla 2.6 se muestran las concentraciones en mg/100 g ES de los aminoácidos tirosina y triptófano solubles de las muestras de queso elaboradas en invierno y primavera (quesos A, B y C). También en la Tabla 2.7 se presentan las medias y desviación standard de estos datos y los resultados del ANOVA y del test de S-N-K. En la Figura 2.6 se muestra la evolución de los mismos a lo largo de la maduración.

Los valores de tirosina aumentaron con el tiempo de maduración en los dos lotes de quesos estudiados y sólo fueron significativamente diferentes entre ambos lotes a los 15 ($p<0,05$), 30 y 150 días ($p<0,001$). En el caso del triptófano los valores aumentaron hasta los 45 días en el caso de las muestras elaboradas en invierno, y hasta los 90 para las de primavera, para luego disminuir hasta el final de la maduración, alcanzando concentraciones finales de 157,61 y 190,35 mg /100 g ES para las muestras de invierno y primavera, respectivamente. El contenido en triptófano fue significativamente superior para las muestras de primavera respecto a las de invierno desde los 60 días hasta el final del período de maduración.

Los valores obtenidos de las concentraciones de tirosina y triptófano para las muestras de quesos Manchegos elaborados en otoño (García-Ruiz, 1996), fueron a los 150 días de maduración, 484,97 y 142,80, respectivamente.

Tabla 2.6: Concentración de los aminoácidos tirosina y triptófano de los quesos Manchegos (A, B y C) elaborados en **INVIERNO** y **PRIMAVERA**.

| Tiempo (días) | | Muestra | Tyr (mg/100 gES) | Trp (mg/100 gES) |
|------------------|-----------|---------|---------------------|---------------------|
| 15 | Invierno | A | 306,35 | 135,78 |
| | | B | 280,48 | 157,78 |
| | | C | 250,01 | 170,50 |
| | Primavera | A | 368,03 | 127,07 |
| | | B | 346,39 | 131,15 |
| | | C | 358,54 | 141,29 |
| 30 | Invierno | A | 316,85 | 144,74 |
| | | B | 315,13 | 149,50 |
| | | C | 323,96 | 195,34 |
| | Primavera | A | 379,22 | 199,31 |
| | | B | 402,57 | 193,62 |
| | | C | 374,01 | 207,41 |
| 45 | Invierno | A | 372,03 | 195,94 |
| | | B | 360,69 | 196,98 |
| | | C | 358,05 | 208,51 |
| | Primavera | A | 413,46 | 226,00 |
| | | B | 429,17 | 191,73 |
| | | C | 365,49 | 232,42 |
| 60 | Invierno | A | 428,29 | 179,41 |
| | | B | 396,90 | 193,66 |
| | | C | 396,06 | 182,91 |
| | Primavera | A | 397,75 | 226,69 |
| | | B | 396,01 | 203,24 |
| | | C | 413,14 | 232,32 |
| 90 | Invierno | A | 421,39 | 161,87 |
| | | B | 446,30 | 171,82 |
| | | C | 430,39 | 203,50 |
| | Primavera | A | 410,93 | 264,92 |
| | | B | 457,26 | 237,93 |
| | | C | 454,01 | 223,43 |
| 120 | Invierno | A | 442,87 | 166,02 |
| | | B | 452,14 | 150,86 |
| | | C | 448,86 | 159,43 |
| | Primavera | A | 399,91 | 204,40 |
| | | B | 475,80 | 176,38 |
| | | C | 456,78 | 192,44 |
| 150 | Invierno | A | 505,40 | 157,56 |
| | | B | 517,34 | 150,49 |
| | | C | 535,13 | 164,78 |
| | Primavera | A | 418,27 | 200,47 |
| | | B | 447,03 | 193,08 |
| | | C | 446,38 | 177,50 |

TABLA 2.7: Valores medios¹ y desviación estándar de las concentraciones de los aminoácidos tyr y trp a lo largo de la maduración de los quesos Manchegos elaborados en **INVIERNO** y **PRIMAVERA**.

| | Tiempo de maduración (días) | INVIERNO | PRIMAVERA | Diferencias entre estaciones de fabricación ² |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|
| Tyr (mg/100 g ES) | 15 | 278,94 ^a ± 28,20 | 357,65 ^a ± 10,85 | * |
| | 30 | 318,65 ^b ± 4,68 | 385,27 ^{a,b} ± 15,21 | ** |
| | 45 | 363,59 ^c ± 7,43 | 402,71 ^{a,b} ± 33,17 | ns |
| | 60 | 407,08 ^d ± 18,37 | 402,30 ^{a,b} ± 9,43 | ns |
| | 90 | 432,69 ^{d,e} ± 12,61 | 440,73 ^b ± 25,86 | ns |
| | 120 | 447,96 ^e ± 4,70 | 444,16 ^b ± 39,49 | ns |
| | 150 | 519,29 ^f ± 14,96 | 437,23 ^b ± 16,42 | ** |
| Trp (mg/100 g ES) | 15 | 154,69 ^a ± 17,57 | 133,17 ^a ± 7,32 | ns |
| | 30 | 163,19 ^{a,b} ± 27,94 | 200,11 ^b ± 6,93 | ns |
| | 45 | 200,48 ^b ± 6,98 | 216,72 ^{b,c} ± 21,88 | ns |
| | 60 | 185,33 ^{a,b} ± 7,43 | 220,75 ^{b,c} ± 15,43 | * |
| | 90 | 179,06 ^{a,b} ± 21,74 | 242,10 ^c ± 21,05 | * |
| | 120 | 158,77 ^a ± 7,60 | 191,08 ^b ± 14,06 | * |
| | 150 | 157,61 ^a ± 7,15 | 190,35 ^b ± 11,72 | * |

¹: Cada valor corresponde a la media del análisis por duplicado, realizado a su vez en tres quesos independientes.

²: Significación estadística de la varianza; ns: no significativo; *: P<0,05; **: P<0,01.

a, b, c, d, e, f, g: Los valores medios en una columna con un superíndice distinto son significativamente diferentes (P<0,05) según el test de Student-Newman-Keuls.

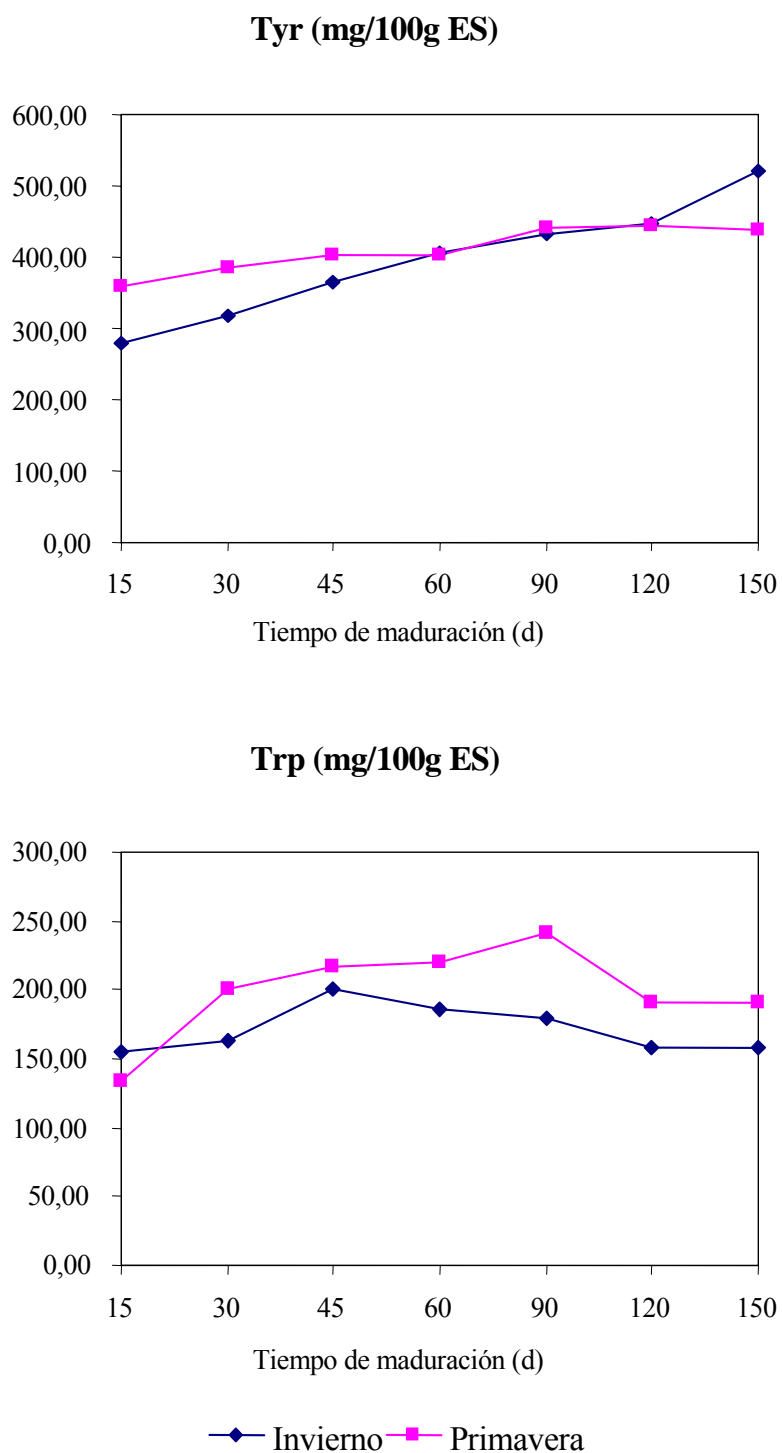


Figura 2.6: Evolución del contenido en tirosina y triptófano a lo largo de la maduración de los quesos Manchegos elaborados en **INVIERNO** y **PRIMAVERA**

2.3.3. Análisis factorial en Componentes Principales

Se aplicó el Análisis de Componentes Principales (ACP) a las muestras de quesos Manchegos elaboradas en invierno y primavera, teniendo en cuenta las variables físico-químicas y de proteólisis secundaria de los quesos de ambos lotes para todas las fechas de maduración: ES (%), pH, Aw, Cloruros (%ES), NP (%ES), NS (%ES), N-PTA (%ES), NS/NT x 100, N-PTA/NT x 100, Tyr (mg/g ES) y Trp (mg/g ES).

En la Tabla 2.8 se muestran los resultados obtenidos del ACP. La varianza total explicada por los dos primeros Componentes Principales (CP) fue del 83,35%. El CP 1 explicó el 54,94% de la varianza total, y las variables más correlacionadas con el mismo fueron ES, NS, Aw, Tyr, NS/NT x 100, N-PTA y N-PTA/NT x 100. El CP 2 explicó el 28,41% de la varianza total y estuvo más correlacionado con los cloruros y con el NP.

La Figura 2.7 muestra la representación en el plano definido por el CP 1 y el CP 2 de las muestras de queso objeto de este estudio. Se puede comprobar que las muestras de ambos lotes se distribuyeron a lo largo del eje CP 1 según su tiempo de maduración, desde los 15 hasta los 150 días, si bien esta separación fue más evidente para las muestras del lote de invierno. Esto podría ser debido a una menos intensa proteólisis experimentada por las muestras de queso elaboradas en primavera, es decir, que los quesos maduraron de una forma más lenta. Por otro lado, a lo largo del eje CP 2 las muestras se agruparon en dos grandes poblaciones, las cuales coinciden con los dos lotes de quesos, el lote elaborado en invierno, en la parte negativa del eje, y en la parte positiva, los quesos elaborados en primavera. Las variables que diferenciaron entre las dos poblaciones de quesos (invierno y primavera) fueron el contenido en cloruros y la proteína total. Estas diferencias parecen estar ocasionadas por las diferencias en la leche de partida empleada en la elaboración de los quesos. Los resultados del ACP pusieron de manifiesto que los quesos se diferenciaron por su tiempo de maduración y por la estación de fabricación, en base a su distinta composición y parámetros proteolíticos, al igual que lo había hecho previamente el ANOVA.

Tabla 2.8: Resultados del Análisis de Componentes Principales de los resultados físico-químicos y de proteólisis secundaria de las muestras de quesos Manchegos fabricados en **INVIERNO** y **PRIMAVERA**.

| Componente Principal | % Varianza explicada | % Varianza acumulada | Variables más correlacionadas con cada Componente Principal y sus coeficientes | |
|----------------------|----------------------|----------------------|--|----------|
| 1 | 54,94 | 54,94 | ES | (0,950) |
| | | | NS | (0,937) |
| | | | Aw | (-0,916) |
| | | | Tyr | (0,905) |
| | | | NS/NT | (0,888) |
| | | | N-PTA | (0,820) |
| | | | N-PTA/NT | (0,813) |
| 2 | 28,41 | 83,35 | Cloruros | (0,936) |
| | | | NP | (0,891) |

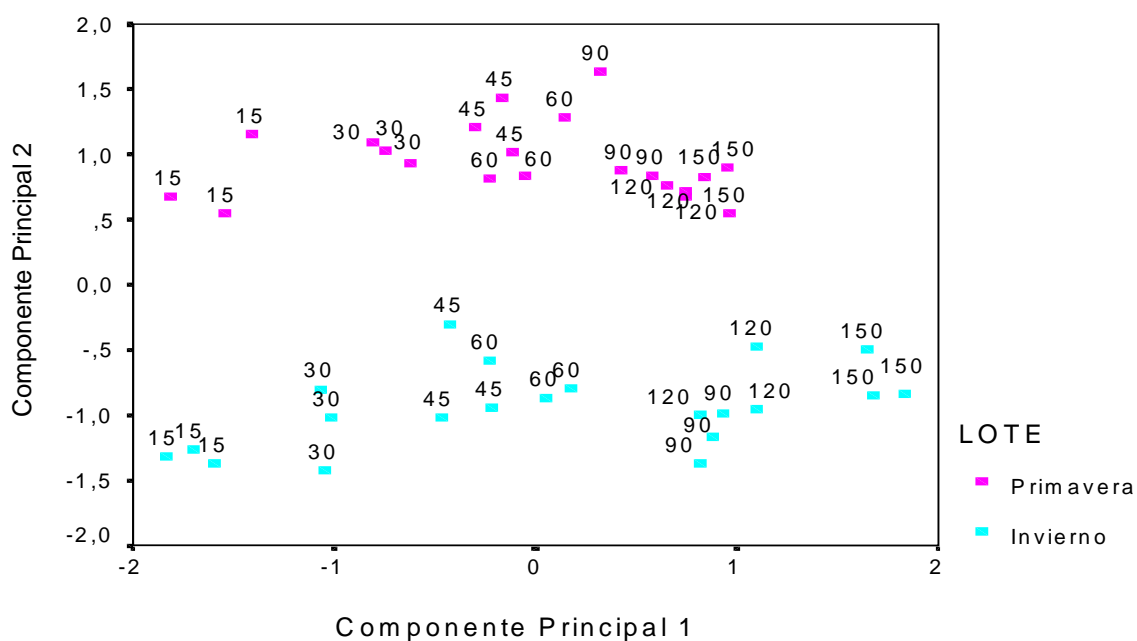


Figura 2.7: Representación de las muestras de queso elaboradas en **INVIERNO** y **PRIMAVERA** en el plano definido por los dos primeros Componentes Principales, obtenidos con los resultados físico-químicos y de proteólisis secundaria.

2.3.4. Predicción del tiempo de maduración del queso Manchego

Una vez efectuado el estudio de las características físico-químicas y de la proteólisis de las muestras de queso Manchegos elaborados en invierno y en primavera, y comprobadas las diferencias existentes entre ambos lotes de quesos, se procedió al estudio de la predicción del tiempo de maduración. Para ello, también se consideraron los datos correspondientes a los análisis físico-químicos y proteólisis de un tercer lote de quesos elaborados en otoño, que fueron analizados previamente (García-Ruiz, 1996, Tesis Doctoral). En primer lugar se realizó la predicción del tiempo de maduración del queso Manchego, se realizó el Análisis de Componentes Principales de los tres lotes de quesos elaborados en las tres estaciones, con el objetivo de comprobar si existían diferencias entre los mismos, al igual que ocurrió con los lotes de invierno y primavera entre sí.

En la Tabla 2.9 se presentan los resultados obtenidos del Análisis de Componentes Principales aplicado a las variables físico-químicas y de proteólisis secundaria de los quesos elaborados en las tres estaciones (invierno, primavera y otoño). Se obtuvieron dos componentes principales, los cuales explicaron el 81,60% de la varianza total. El CP 1 estuvo correlacionado con las fracciones nitrogenadas, el ES, la Aw y la concentración de tirosina, y el CP 2 estuvo más correlacionado con el contenido en proteína total y con los cloruros, al igual que ocurría al aplicar el ACP a los lotes de invierno y primavera.

La Figura 2.8 muestra la representación de las muestras en el plano definido por el CP 1 y el CP 2. Se puede observar que las muestras se distribuyeron a lo largo del eje CP 1 según su tiempo de maduración creciente, y a lo largo del eje CP 2 las muestras se agruparon en general, en tres poblaciones, coincidiendo con los quesos elaborados en las tres estaciones consideradas, al igual que ocurrió en el caso del ACP aplicado a los lotes de invierno y primavera, si bien las muestras de quesos elaborados en otoño e invierno aparecen algo más próximas entre sí en las últimas fechas de maduración.

Tabla 2.9: Resultados del Análisis de Componentes Principales de las variables físico-químicas y de proteólisis secundaria de las muestras de quesos Manchegos fabricados en **INVIERNO**, **PRIMAVERA** y **OTOÑO**

| Componente Principal | % Varianza explicada | % Varianza acumulada | Variables más correlacionadas con cada Componente Principal y sus coeficientes | |
|----------------------|----------------------|----------------------|--|----------|
| 1 | 54,50 | 54,50 | NS | (0,963) |
| | | | NS/NT | (0,933) |
| | | | ES | (0,911) |
| | | | N-PTA/NT | (0,903) |
| | | | N-PTA | (0,900) |
| | | | Aw | (-0,840) |
| | | | Tyr | (0,791) |
| 2 | 27,10 | 81,60 | NP | (0,868) |
| | | | Cloruros | (0,859) |

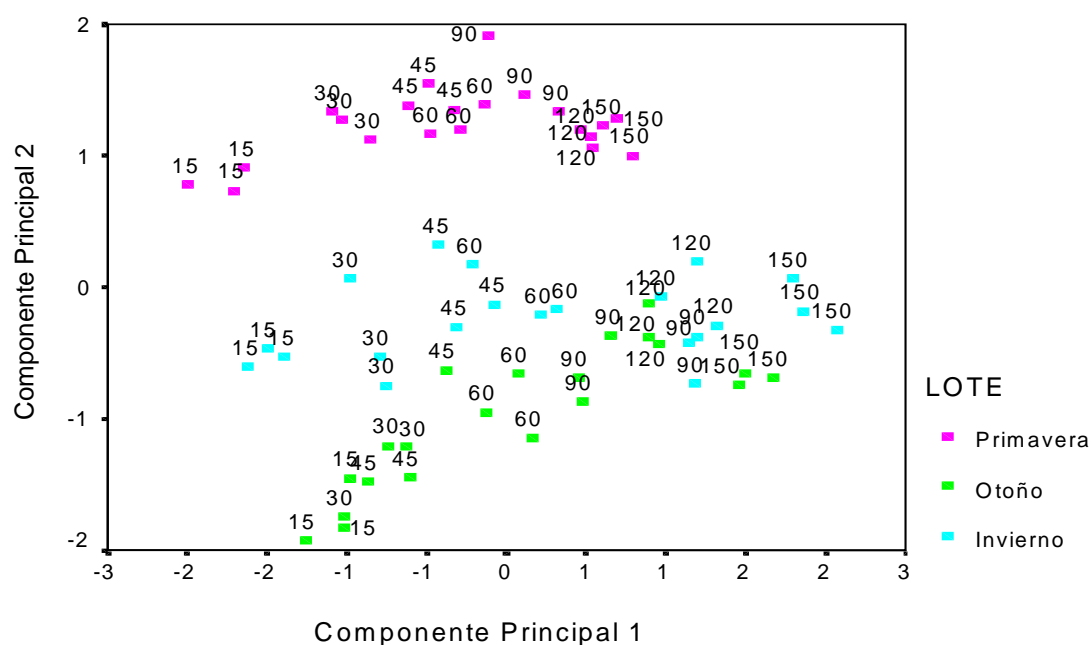


Figura 2.8: Representación de las muestras de queso elaboradas en **INVIERNO**, **PRIMAVERA** y **OTOÑO**, en el plano definido por los dos primeros Componentes Principales, obtenidos con las variables físico-químicas y de proteólisis secundaria.

Los quesos elaborados en las distintas estaciones se diferenciaron entre sí fundamentalmente por el contenido total en proteína y en cloruros. Estos parámetros generalmente no presentan oscilaciones significativas a lo largo de la maduración del queso, por lo que las únicas diferencias entre los quesos elaborados en distintas estaciones podrían estar causadas, por tanto, por la distinta composición de la leche de partida (originada por el estado de lactación del animal, su alimentación, etc) y por un diferente tratamiento de la cuajada en la elaboración de los quesos, especialmente en el salado y sobre todo al tratarse de una elaboración semiindustrial, como en este caso.

A continuación, se intentó elaborar un modelo estadístico de predicción del tiempo de maduración para mejorar la ecuación propuesta por García-Ruiz *et al.* (1998). Estos autores obtuvieron, utilizando los datos correspondientes a un lote de quesos Manchegos elaborados en otoño, a escala semiindustrial y madurados durante 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 días, mediante PLS (Partial Least Squares), la siguiente ecuación para predecir el tiempo de maduración de quesos Manchegos del mercado:

$$\text{tiempo} = -141,895 - 531,794 A_w + 103,871 \text{ pH} + 6,236 \text{ NT} + 32,192 \text{ NS} + 1,838 \text{ NS/NT} + 10,704 \text{ N-PTA/NT}$$

con un $R^2 = 0,969$, $SD = 9,15$ y $\text{RMSEP}_{\text{valid}} = 10,30$ días,

donde:

R^2 es el coeficiente de determinación,

SD es la desviación estándar residual,

y $\text{RMSEP}_{\text{valid}}$ (RMSEP de validación interna) es el error medio de predicción de validación del modelo, que se aplica al conjunto de muestras con el cual se ha obtenido el modelo de predicción, y se define matemáticamente como:

$$\text{RMSEP}_{\text{valid}} = \left(\sum_{i=1}^n (t_i - t_{(i)})^2 / n \right)^{1/2}$$

siendo:

t_i = tiempo real de maduración de los quesos del conjunto de calibrado,

$t_{(i)}$ = tiempo predicho cuando la muestra i -ésima es eliminada para el cálculo del modelo,

n = número de muestras en el conjunto de calibrado (en este caso, $n=21$).

En el presente trabajo se realizó un estudio similar encaminado a la mejora de esta ecuación, incluyendo un mayor número de muestras en el análisis estadístico y considerando en este caso otros dos lotes de quesos elaborados en otras dos estaciones (primavera e invierno), con el objetivo de incluir el posible efecto de la época de fabricación.

Así, en primer lugar se obtuvo un modelo de PLS de predicción del tiempo de maduración con los datos del lote de invierno. Utilizando estos datos de invierno y las once variables predictoras: Aw, pH, ES, Cloruros, NT, NS, N-PTA, NS/NT, N-PTA/NT, Tyr y Trp, se obtuvo el siguiente modelo de PLS, en el cual se necesitaron 4 componentes:

$$\text{tiempo} = -685,00 \text{ Aw} - 98,81 \text{ pH} + 2,77 \text{ ES} - 6,99 \text{ Cloruros} + 31,08 \text{ NT} + 15,20 \text{ NS} - 8,64 \text{ NS/NT} + 42,64 \text{ N-PTA} + 2,67 \text{ N-PTA/NT} + 0,10 \text{ Tyr} - 0,19 \text{ Trp} + 840,30$$

$$\text{con } R^2 = 0,983, \text{ } s = 5,19 \text{ y } \text{RMSEP}_{\text{valid.}} = 8,83 \text{ días}$$

Los valores predichos con este modelo para todos los quesos de los tres lotes (invierno, primavera y otoño) se representan gráficamente en la Figura 2.9:

En esta representación se observa que la dispersión de las muestras es bastante notable. Además, esto también se reflejó en el RMSEP de validación externa o de evaluación ($\text{RMSEP}_{\text{eval}}$), que es el error medio de predicción de evaluación del modelo, y se aplica al conjunto de muestras en el cual se quiere realizar la predicción, y se define matemáticamente como:

$$\text{RMSEP}_{\text{eval}} = \left(\sum_{i=1}^e (t_i - t_{(i)})^2 / e \right)^{1/2}$$

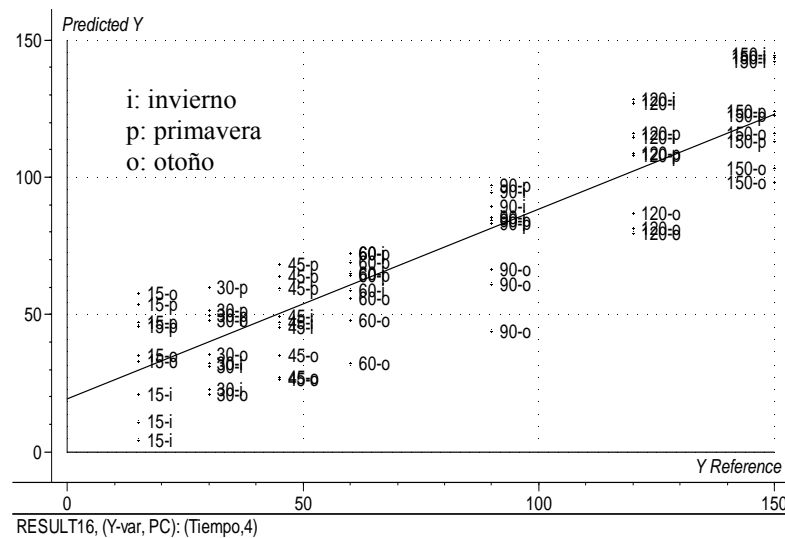


Figura 2.9: Representación gráfica de los valores predichos para los quesos de los tres lotes con el modelo de PLS correspondiente a los datos de **INVIERNO**

donde:

e = n° de muestras del conjunto de evaluación

t_i = tiempo real de maduración

$t_{(i)}$ = tiempo predicho por el modelo

Al calcular el $RMSEP_{eval}$ sobre las poblaciones de quesos de primavera y otoño, éste resultó ser de 25,91 días, el cual es un valor demasiado alto.

Paralelamente, se realizó el mismo planteamiento, es decir, la elaboración de una ecuación de predicción, con el lote de primavera (P); después combinando los lotes dos a dos: invierno y primavera (I+P), otoño e invierno (O+I) y otoño y primavera (O+P) y, finalmente, con los tres lotes: invierno, primavera y otoño (I+P+O) y se obtuvieron los modelos estadísticos cuyas características se recogen en la Tabla 2.10:

Tabla 2.10: Modelos estadísticos de PLS de predicción del tiempo de maduración para los lotes de quesos Manchegos de **OTOÑO (O)**, **PRIMAVERA (P)** e **INVIERNO (I)** y sus combinaciones.

| Grupo de validación | NC* | s | R ² | RMSEP _{valid} | Grupo de evaluación | RMSEP _{eval} |
|---------------------|-----|------|----------------|------------------------|---------------------|-----------------------|
| Lote I | 4 | 5,19 | 0,983 | 8,83 | Lotes P+O | 25,91 |
| Lote P | 4 | 4,57 | 0,987 | 10,11 | Lotes I+O | 16,51 |
| Lotes I+P | 4 | 6,63 | 0,976 | 8,93 | Lote O | 18,03 |
| Lotes O+I | 4 | 6,70 | 0,975 | 8,90 | Lote P | 10,65 |
| Lotes O+P | 3 | 8,17 | 0,964 | 10,63 | Lote I | 18,82 |
| Lotes I+P+O | 3 | 9,03 | 0,958 | 10,50 | - | - |

*: Número de componentes

Seguidamente, y para mejorar los modelos anteriores, ya que en todos se necesitaron al menos 3 componentes para explicar la varianza total, lo cual aún es un número elevado de componentes, se obtuvo una nueva ecuación de predicción del tiempo de maduración, con los quesos de los tres lotes, utilizando en este caso los cuadrados de las variables y sus dobles productos:

$$\text{tiempo} = 200,04 - 245,32 \text{ Aw} + 1,09 \text{ ES} - 128,76 \text{ Aw}^2 + 5,30 \text{ Aw pH} + 1,38 \text{ Aw ES} - 20,10 \text{ Aw NT} + 0,21 \text{ pH ES} + 0,01 \text{ ES}^2 + 0,02 \text{ ES [Cloruros]} + 0,07 \text{ ES NT} + 0,26 \text{ ES NS} + 9,10 \times 10^{-4} \text{ ES [tyr]}$$

En este caso se obtuvieron 2 componentes principales y unos valores de:

$$s=7,69,$$

$$R^2=0,970$$

$$\text{y RMSEP}_{\text{valid}}=8,31 \text{ días.}$$

En la Tabla 2.11 se presentan los valores predichos, en validación, con este modelo para el tiempo de maduración de los quesos de cada uno de los tres lotes (otoño, invierno y primavera).

Tabla 2.11: Valores medios predichos para el tiempo de maduración de los quesos Manchegos elaborados en **OTOÑO**, **INVIERNO** y **PRIMAVERA**

| OTOÑO | | INVIERNO | | PRIMAVERA | |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| Tiempo real (d) | Tiempo predicho (d) | Tiempo real (d) | Tiempo predicho (d) | Tiempo real (d) | Tiempo predicho (d) |
| 15 | 18 | 15 | 12 | 15 | 11 |
| 30 | 39 | 30 | 30 | 30 | 37 |
| 45 | 45 | 45 | 55 | 45 | 59 |
| 60 | 72 | 60 | 73 | 60 | 75 |
| 90 | 91 | 90 | 99 | 90 | 100 |
| 120 | 125 | 120 | 134 | 120 | 122 |
| 150 | 152 | 150 | 154 | 150 | 143 |

A continuación, y para seguir mejorando el modelo de predicción, se aplicó la regresión lineal múltiple por mínimos cuadrados a las once variables, la cual puso de manifiesto que las variables que influían más significativamente en el tiempo de maduración fueron la Aw, el pH y el ES. Por ello, y con el objetivo de reducir el número de variables necesario para predecir el tiempo de maduración, se consideraron únicamente estas variables y se introdujeron además sus cuadrados y sus dobles productos, con el objetivo de mejorar el modelo. Así, se obtuvo la siguiente ecuación de predicción del tiempo de maduración:

$$\text{tiempo} = -364,400 \text{ Aw} + 41,902 \text{ pH} + 1,344 \text{ ES} - 22,275 \text{ Aw pH} + 1,804 \text{ Aw ES} + 0,252 \text{ pH ES} - 192,406 \text{ Aw}^2 + 4,179 \text{ pH}^2 + 0,011 \text{ ES}^2 + 75,168$$

con sólo 2 componentes, y con las siguientes características:

$$R^2 = 0,984,$$

$$s = 7,88 \text{ y}$$

$$\text{RMSEP}_{\text{valid}} = 8,48 \text{ días.}$$

Estos valores mejoran algo los anteriores y el modelo presenta la ventaja de utilizar sólo las tres variables mencionadas, con lo cual la predicción del tiempo de maduración sería mucho más sencilla y rápida de conocer, realizando únicamente estos sencillos análisis.

La representación gráfica de los valores predichos (en validación), en función de los reales utilizando este modelo, se muestra en la Figura 2.10:

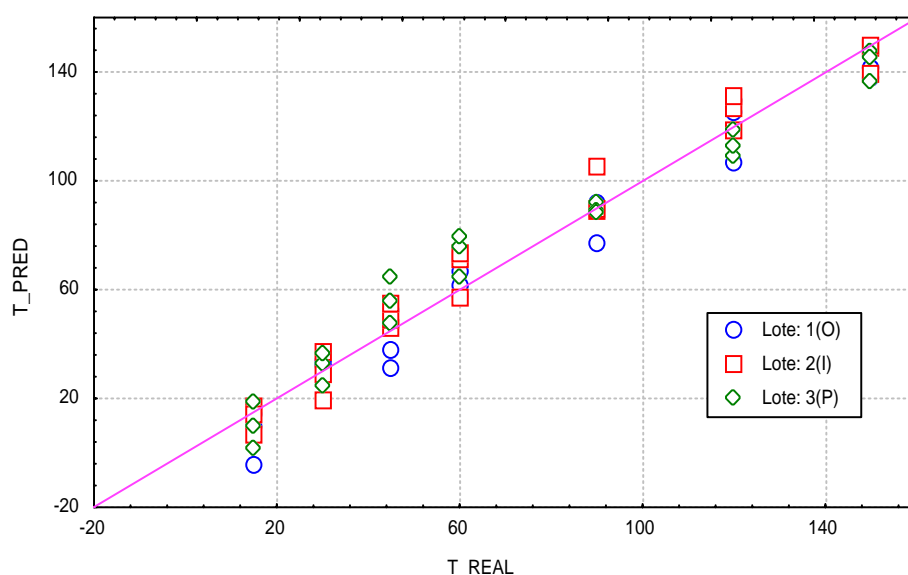


Figura 2.10: Representación gráfica de los valores predichos (en validación), en función de los reales para los quesos de los tres lotes con el modelo de tres variables (A_w , pH y ES), obtenido con los lotes de **OTOÑO (O)**, **INVIERNO (I)** y **PRIMAVERA (P)**.

A continuación se procedió a realizar la evaluación del modelo, utilizando para ello un conjunto de muestras diferente al conjunto con el cual se había formulado el modelo. Así, este modelo de predicción con sólo tres variables se aplicó a los datos correspondientes a un lote de quesos Manchegos comerciales, elaborados en la misma fábrica que los anteriores y madurados durante los mismos períodos de tiempo. Estos quesos constituyeron el conjunto de evaluación 1. Los valores predichos se presentan en la Tabla 2.12.

Tabla 2.12: Valores predichos con el modelo de tres variables (A_w , pH y ES) del tiempo de maduración de las muestras de quesos Manchegos comerciales del conjunto de evaluación 1

| Tiempo real (d) | Tiempo predicho (d) |
|--------------------|------------------------|
| 15 | 20,70 |
| 15 | 26,80 |
| 15 | 26,23 |
| 30 | 43,11 |
| 30 | 45,96 |
| 30 | 47,79 |
| 45 | 46,45 |
| 45 | 40,83 |
| 45 | 35,94 |
| 60 | 49,91 |
| 60 | 52,23 |
| 60 | 57,43 |
| 90 | 77,66 |
| 90 | 83,42 |
| 90 | 71,78 |
| 120 | 83,28 |
| 120 | 87,80 |
| 120 | 91,88 |
| 150 | 142,69 |
| 150 | 127,56 |
| 150 | 131,64 |

Los valores predichos para el tiempo de maduración de las 21 muestras de quesos comerciales (conjunto de evaluación 1), con este modelo, se representan en función de los valores reales en la Figura 2.11.

En este caso, se obtuvo un $RMSEP_{eval}$ de 15,1 días.

En la Figura 2.11 se observa que existió un mayor error en la predicción para las muestras de quesos de 120 días de maduración.

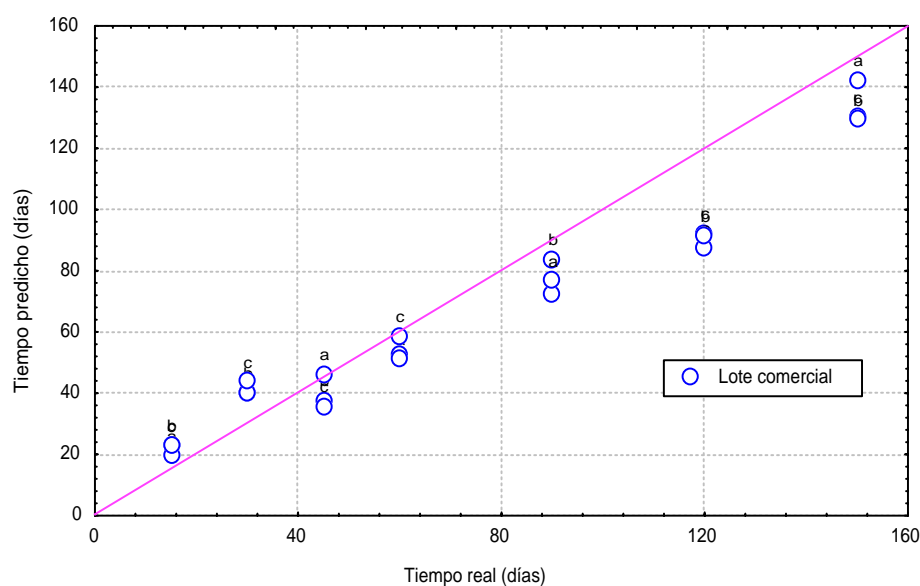


Figura 2.11: Representación gráfica de los valores predichos en función de los reales para los quesos comerciales del conjunto de evaluación 1 con el modelo de tres variables (A_w , pH y ES)

Por último, se aplicó también este modelo de predicción a una serie de quesos Manchegos industriales del mercado, de diferentes tiempos de maduración (2, 4, 6, 8 y 12 meses), elaborados en distintas fábricas registradas en la D. O. “Manchego”, y se obtuvieron los valores de predicción que aparecen en la Tabla 2.13.

Tabla 2.13: Valores predichos con el modelo de tres variables (A_w , pH y ES) para los quesos Manchegos comerciales del conjunto de evaluación 2

| Muestra* | Tiempo real (d) | Tiempo predicho (d) |
|-----------------|----------------------------|--------------------------------|
| 2MA | 60 | 50,72 |
| 2MB | 60 | 66,93 |
| 2MC | 60 | 80,59 |
| 2MD | 60 | 93,04 |
| 2ME | 60 | 116,35 |
| 2MF | 60 | 111,52 |
| 4MA | 120 | 93,17 |
| 4MB | 120 | 127,18 |
| 4MC | 120 | 106,92 |
| 4MD | 120 | 83,57 |
| 6MA | 180 | 120,17 |
| 6MB | 180 | 157,43 |
| 6MC | 180 | 125,53 |
| 6MD | 180 | 130,98 |
| 6ME | 180 | 129,25 |
| 6MF | 180 | 131,48 |
| 8MA | 240 | 181,17 |
| 8MB | 240 | 171,06 |
| 12ME | 360 | 181,18 |
| 12MF | 360 | 163,46 |

* A, B, C, D, E y F corresponden a las distintas fábricas

Los valores predichos con este modelo para el tiempo de maduración de las muestras de quesos comerciales del conjunto de evaluación 2, se representan en función de los valores reales en la Figura 2.12.

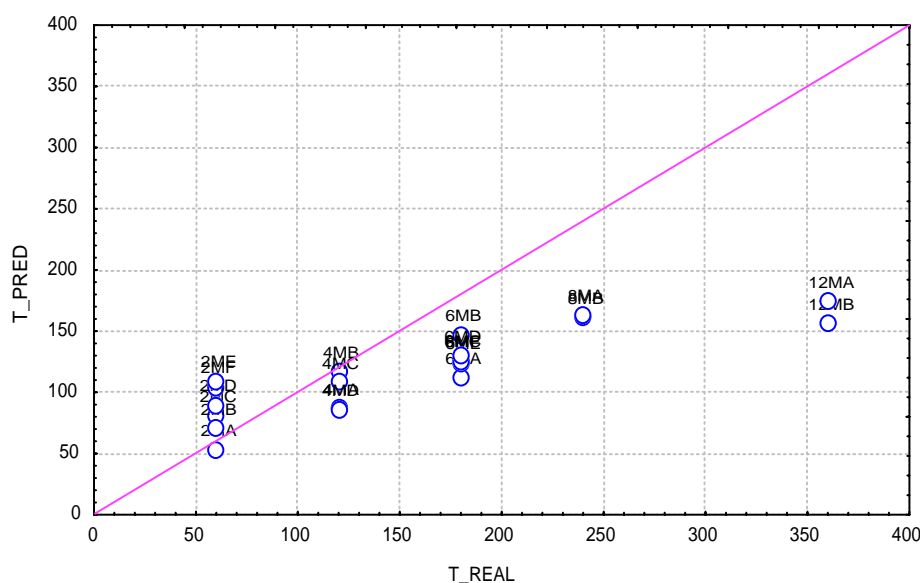


Figura 2.12: Representación gráfica de los valores predichos en función de los reales para los quesos comerciales del conjunto de evaluación 2 con el modelo de tres variables (A_w , pH y ES)

Cabe resaltar que el modelo de predicción se ajustó mejor para las muestras con tiempos de maduración cortos (hasta los 4-6 meses), pero no dio buenos resultados para las muestras con un tiempo de maduración superior.

Esto podría ser debido a que el modelo de predicción se obtuvo con muestras de quesos madurados durante un tiempo máximo de 150 días (5 meses), con lo cual, el modelo no se podría utilizar para realizar la predicción de muestras de quesos con tiempos de maduración superiores.

Además, también cabe destacar que, para muestras con un mismo tiempo real de maduración, hubo diferencias en el tiempo predicho según la fábrica donde habían sido elaborados los quesos (Tabla 2.13).

2.4. CONCLUSIONES

1. Se encontraron diferencias significativas entre los dos lotes de quesos Manchegos elaborados en invierno y primavera en todas las variables físico-químicas analizadas en la mayoría de las fechas de maduración estudiadas, a excepción del ES.
2. La proteólisis primaria fue más intensa en los quesos Manchegos elaborados en invierno, donde se observó una mayor intensidad de las bandas correspondientes a los productos de degradación de las α y β -caseínas.
3. Las concentraciones de nitrógeno soluble en agua y nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico aumentaron de forma significativa y progresivamente conforme avanzaba el tiempo de maduración en los dos lotes de quesos estudiados (invierno y primavera). Las diferencias entre los dos lotes empezaron a ser significativas a partir de los 60 días de maduración.
4. El ACP aplicado a las variables físico-químicas y a las fracciones nitrogenadas de los dos lotes de quesos Manchegos separó las muestras a lo largo del CP 2 en dos grupos bien diferenciados (quesos de primavera y quesos de invierno). Las muestras se separaron según su tiempo de maduración a lo largo del CP 1.
5. La Regresión Lineal Múltiple por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) puso de manifiesto que las variables más correlacionadas con el tiempo de maduración de los quesos fueron la A_w , el pH y el ES. De esta forma se mejoró la ecuación de predicción del tiempo de maduración del queso Manchego propuesta por García-Ruiz et al. (1998), utilizando únicamente estas variables junto con sus cuadrados y sus dobles productos.
6. Al aplicar este modelo de predicción a un lote de quesos Manchegos comerciales elaborados en la misma fábrica y madurados durante los mismos períodos de tiempo que los quesos utilizados para formular la ecuación, el error de predicción RMSEP_{eval} fue de tan solo 15 días.

7. En el caso de la predicción del tiempo de maduración de los quesos Manchegos elaborados en una fábrica diferente a la de los quesos con los cuales se formuló el modelo de predicción, el tiempo de maduración predicho se ajustó más al real para las muestras de quesos con un tiempo de maduración entre 4 a 6 meses.

2.5. BIBLIOGRAFÍA

- AOAC: Official Methods of Analysis. (1995). 13th edition. Washington DC.
- Assenat, L. (1967). Contribution a l'étude d'une méthode d'identification des laits et des fromages ou moyen de l'electrophorèse sur gel polyacrilamide. *Le Lait* 47, 393-414, 496-502.
- Bütikofer, V, Rüegg, M. y Ardö, Y. (1993). Determination of nitrogen fractions in cheese: evaluation of a collaborative study. *Lebensmittel Wissenschaft Technology* 20, 271-275.
- Cabezas, L., Martín-Álvarez, P. J. y Cabezudo, M. D. (1993). Proteolysis in Gruyère de Comté cheese accentuating the effect of traditional salting. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 33, 501-516.
- Collin, J.C., Berdaqué, J.L., Dognin-Bergeret, M. y Grappin, R. (1987). Affinage et qualité du Gruyère de Comté. IV. Étude de la protéolyse. *Le Lait* 67, 299-318.
- Fernández-García, E., Ramos, M., Polo, C., Juárez, M. y Olano, A. (1988). Enzyme accelerated ripening of Spanish hard cheese. *Food Chemistry* 28, 63-80.
- FIL: Federación Internacional de Lechería (1982). Norma nº 4 A.
- Fontecha J., Peláez, C. y Juárez, M. (1994). Biochemical characteristics of a semi-hard ewe's milk cheese. *Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung Forschung* 198, 24-28.
- Fox, P.F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science* 72, 1379-1400.

- Franco, C. M., Quinto, E. J., Centeno, J. A., Acitores, M. I. y Cepeda, A. (1992). Ejemplo de caracterización de quesos comerciales tipo Manchego, mediante la utilización del análisis discriminante BMDP7M. *Anales de Bromatología* 44, 199-202.

- García-Ruiz, A. (1996). Estudio estadístico para predecir el tiempo de maduración del queso Manchego e identificación de la microbiota. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Castilla-La Mancha. Ciudad Real.

- García-Ruiz, A., Cabezas, L., Martín-Álvarez, P. J. y Cabezudo, M. D. (1998). Prediction of the ripening times of Manchego cheese using multivariate statistical analyse: a preliminary study. *Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung Forschung A* 206, 382-386.

- Gaya, P., Medina, M., Rodríguez-Marín, M. A. y Núñez, M. (1990). Accelerated ripening of ewes' milk Manchego cheese: The effect of elevated ripening temperatures. *Journal of Dairy Science* 73, 26-32.

- Gómez, M. J., Rodríguez, E., Gaya, P., Núñez, M. y Medina, M. (1999). Characteristics of Manchego cheese manufactured from raw and pasteurized ovine milk and with defined-strain or commercial mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science* 82, 2300-2307.

- Guindeo, M. J., Astiasarán, Y. y Bello, J. (1990). Estudio del proceso de maduración del queso Urbasa elaborado de modo artesanal con leche de oveja de la raza lacha. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 3014, 469-475.

- Heiss, E. (1961). Essai de dosage de la matière grasse dans le fromage par des methodes rapides. *Dtsch. Molk. Ztg.* 82, 67-70.

- Ibáñez, F. C., Torres, M. I., Ordóñez, A. I. y Barcina, Y. (1995). Effect of composition and ripening on casein breakdown in Idiazábal cheese. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 17 (1/2) 37-44.
- Kosikowski, F.V. (1982). Analysis. *Cheese and fermented milk foods*. F. V. Kosikowski and Associated, Brooktondale, New York.
- Kuchroo, C.N. y Fox, P.F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheeses: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft* 37, 331-335.
- Lawrence, R. C., Creamer, L. K. y Gilles, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 70, 1748- 1760.
- Macedo, A. C. y Malcata, F. X. (1996). Changes in the major free fatty acids in Serra cheese throughout ripening. *International Dairy Journal* 6, 1087-1097.
- Martens, H. y Naes, T. (1993). *Multivariate calibration*. Wiley, Chichester.
- Mohedano, A. F., Fernández, J., Garde, S., Medina, M., Gaya, P. y Núñez, M. (1998). The effect of the cysteine proteinase from *Micrococcus sp.* INIA 528 on the ripening process of Manchego cheese. *Enzyme and Microbial Technology* 22, 391-396.
- Molina, E. y Martín-Álvarez, P. J. (1996). Comparación de diferentes técnicas de regresión para la predicción de los porcentajes de leche de vaca, oveja y cabra en queso de mezcla. *Revista Española de Lechería* 73, 33-43.
- Picón, A., Gaya, M., Medina, M. y Núñez, M. (1995). The effect of liposome-encapsulated *Bacillus subtilis* neutral proteinase on Manchego cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 78, 1238-1247.

- Ramos, M., Martínez-Castro, I. y Juárez, M. (1977). Detection of cow's milk in Manchego cheese. *Journal of Dairy Science* 60, 870-877.
- Santa-María, G., Ramos, M. y Ordóñez, J. A. (1986). Application of linear discriminant analysis to the different proteolysis parameters for assessing the ripening of Manchego cheese. *Food Chemistry* 19, 225-234.
- Schroeder, C. L., Bodyfelt, F. W., Wiatt, C. J. y McDaniel, M. R. (1988). Reduction of sodium chloride in Cheddar cheese: effect on sensory, microbiological and chemical properties. *Journal of Dairy Science* 71, 2010.
- SPSS for Windows. (1999). Version 9.0.1.
- Uceda, R., Guillén, A. M., Gaya, P., Medina, M. y Núñez, M. (1994). Chemical and rheological characteristics of Manchego cheese manufactured from ewe raw milk preserved by activation of the lactoperoxidase system. *Milchwissenschaft* 49, 494-499.
- Unscrambler User's Guide. (1996). Camo A/, Trondheim.
- Vakaleris, B. y Price, W. (1959). A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 42, 264-276.

CAPÍTULO 3

LIPOLISIS EN EL QUESO MANCHEGO: ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS GRASOS LIBRES A LO LARGO DE LA MADURACIÓN Y SEGÚN LA ÉPOCA DE FABRICACIÓN

3.1. INTRODUCCIÓN: ESTADO ACTUAL DEL TEMA

La grasa del queso afecta a su calidad de varias formas: en cuanto al aporte nutricional, por su contribución a las características reológicas y estructurales y, fundamentalmente, por su papel en el desarrollo del aroma. Esta participación de la grasa del queso en la formación del aroma está determinada por el contenido en ácidos grasos libres (AGL), bien de una forma directa, por el sabor que confieren de por sí los AGL de cadena corta y media, o bien indirectamente, como precursores de otras sustancias responsables del aroma como metil-cetonas, alcoholes, lactonas y ésteres (Forss, 1979). Los ácidos grasos de cadena corta confieren a los quesos características sensoriales propias, ya que presentan umbrales de percepción muy bajos (Brennaud *et al.*, 1989) y son responsables de sabores fuertes y picantes (De la Fuente *et al.*, 1993).

Los AGL contribuyen al aroma y al sabor de muchos tipos de quesos. Quesos duros italianos como el Parmesano y Romano, el queso Majorero, de Fuerteventura, y quesos azules como el Roquefort, Stilton, Gorgonzola, Danablu y Cabrales deben sus sabores característicos a los niveles relativamente elevados de AGL producidos durante la maduración, debido a las lipasas presentes en las pastas de cuajo sin purificar empleadas en su fabricación o por las lipasas fúngicas, según cada variedad. Además, en quesos en los que los niveles de AGL son relativamente bajos, como el Cheddar, Gouda, Emmental y Manchego, los AGL aportan, sin embargo, una contribución esencial al aroma del queso (Stadhouders y Veringa, 1973; Otherholm *et al.*, 1976; Law y Sharpe, 1977; Fernández-García *et al.*, 1988).

En general, se consideran dos fuentes principales para la formación de AGL en quesos madurados. En primer lugar, por lipólisis de la grasa de la leche y, en segundo lugar, a partir de la metabolización de hidratos de carbono y proteínas por las bacterias lácticas; así, ácidos como el acético, propiónico y butírico pueden provenir de fermentaciones. Aunque se considera que es la vía lipolítica la ruta principal para la formación de AGL en el queso (Bills *et al.*, 1969).

La actividad lipolítica en el queso es bien conocida (Albrecht y Jaynes, 1955; Deeth y Fitzgerald, 1976; Sorhaug y Stepaniak, 1977; El Soda, 1986; Driessen, 1989; Olivecrona y Bengtson-Olivecrona, 1991); se sabe que las lipasas pueden proceder de la leche (lipasa nativa, aunque no resiste la pasteurización) de los microorganismos (microbiota nativa de la leche, microorganismos añadidos como cultivo iniciador y como flora secundaria, como son las lipasas fúngicas) y esterases pregástricas que se encuentran en las preparaciones de cuajo sin purificar (De la Fuente y Juárez, 1993).

La extensión de la lipólisis puede evaluarse mediante la determinación de los AGL (Woo *et al.*, 1984). La concentración de AGL en el queso depende de la composición estacional de la leche. Así, depende de la alimentación del animal y de sus condiciones fisiológicas (estado de lactación, edad y variación genética) y de la relativa actividad lipásica (Anon, 1991; Nájera *et al.*, 1993). Así por ejemplo, la proporción relativa del ácido butírico alcanza su mínimo al final del período de lactación (en julio), mientras que el máximo se presenta al comienzo. Los ácidos esteárico y oleico siguen una evolución inversa (Routaboul, 1981).

La composición cualitativa de los ácidos grasos de la grasa láctea de oveja es similar a la de vaca y cabra, presentando más de 64 ácidos grasos, aunque se observan diferencias entre las tres especies animales (Walstra y Jennes, 1984; Galvano y Scena, 1984). Así, la grasa de la leche de oveja y de la de cabra poseen un mayor contenido de ácidos grasos de cadena corta y media que la grasa de la leche de vaca (20-25% frente a 10-12%, respectivamente), mientras que su contenido en ácidos grasos insaturados es inferior al de la leche de vaca (Lowenstein *et al.*, 1980; Anifantakis, 1986; González de Llano y Ramos, 1989). El perfil de AGL en quesos de oveja ha sido estudiado por diversos autores como Olmedo y Coll-Hellín (1976) y Gatusso y Fazio (1980), quienes mostraron que los AGL que se encuentran en la leche en mayores concentraciones son los ácidos palmítico y oleico y, en menor cantidad, caproico, caprílico, linoleico y linolénico. El olor y el gusto característicos de la leche de oveja están en estrecha relación con su contenido en AGL de cadena corta y media (Luquet, 1991).

La extensión de la lipólisis se ha usado como un índice de la maduración en muchos tipos de queso. En el queso Manchego la lipólisis no es muy importante en términos cuantitativos (Ramos y Martínez-Castro, 1976), pero desde el punto de vista cualitativo juega un papel esencial en el desarrollo de su aroma típico (Fernández-García *et al.*, 1988).

En la bibliografía revisada existen pocos trabajos acerca del estudio de la lipólisis en el queso Manchego. En algunos sólo se analizan los AGL totales mediante valoración con KOH etanólica (Núñez *et al.*, 1986a, b). Se han encontrado trabajos que estudian la composición en ácidos grasos totales en queso Manchego conservado en aceite de oliva (Juárez *et al.*, 1980) y de AGL también en queso Manchego conservado en aceite de oliva (De la Fuente *et al.*, 1993).

Los **objetivos** de este trabajo fueron conocer la composición en AGL del queso Manchego, estudiar su evolución con el tiempo de maduración y comprobar si las diferencias en la composición estacional de la leche de partida tienen algún efecto en las concentraciones de AGL encontradas en el queso.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Material experimental

Como material experimental se emplearon tres lotes de quesos elaborados a escala semiindustrial en tres épocas distintas del año (primavera, otoño e invierno), siguiendo la tecnología del Manchego. En cada lote se fabricaron 21 quesos de un peso aproximado de 1,5 Kg. Los quesos recién elaborados fueron transportados en refrigeración hasta el laboratorio, donde se almacenaron en una cámara de maduración a 14 °C y a una humedad relativa del 80%. Los quesos fueron madurados durante 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 días, y para cada período de maduración se destinaron tres quesos individuales, con lo cual, el número total de quesos elaborados fue de 63 (El lote de quesos elaborados en otoño fue objeto de un estudio previo (García-Ruiz, 1996).

Para realizar el análisis se cortó una muestra en forma de cuña de unos 100 g de cada uno de los tres quesos correspondientes a cada tiempo de maduración. Las muestras se trituraron con una picadora eléctrica y se mezclaron homogéneamente, siendo congeladas a -20 °C hasta efectuar el análisis.

3.2.2. Método de extracción de los ácidos grasos libres

El método utilizado para el análisis de los AGL de las muestras de queso fue el propuesto por Metcalfe y Wang (1981), modificado posteriormente por Juárez *et al.* (1992). Este método presenta la ventaja de que se pueden obtener en un único paso y en fases separadas los metilésteres de los AGL y de los ácidos grasos de los triglicéridos. Consiste en la extracción de la grasa del queso con éter etílico en una papilla acidificada hasta pH 1,5 con ácido sulfúrico. Como patrón interno se utilizó una disolución de ácido n-nonanoico al 0,6% p/v en éter etílico. La metilación de los ácidos grasos de las fracciones glicerídica y de la de AGL se llevó a cabo empleando como catalizador hidróxido de tetrametilamonio (HTMA) al 20% en metanol. El empleo de HTMA permite la transformación de los glicéridos en ésteres metílicos y, en unos instantes, a temperatura ambiente y en fase separada, se obtiene la conversión de los AGL en jabones de TMA,

que se convierten en ésteres metílicos en el inyector del cromatógrafo. En la Figura 3.1 se muestra un esquema del procedimiento seguido en la extracción.

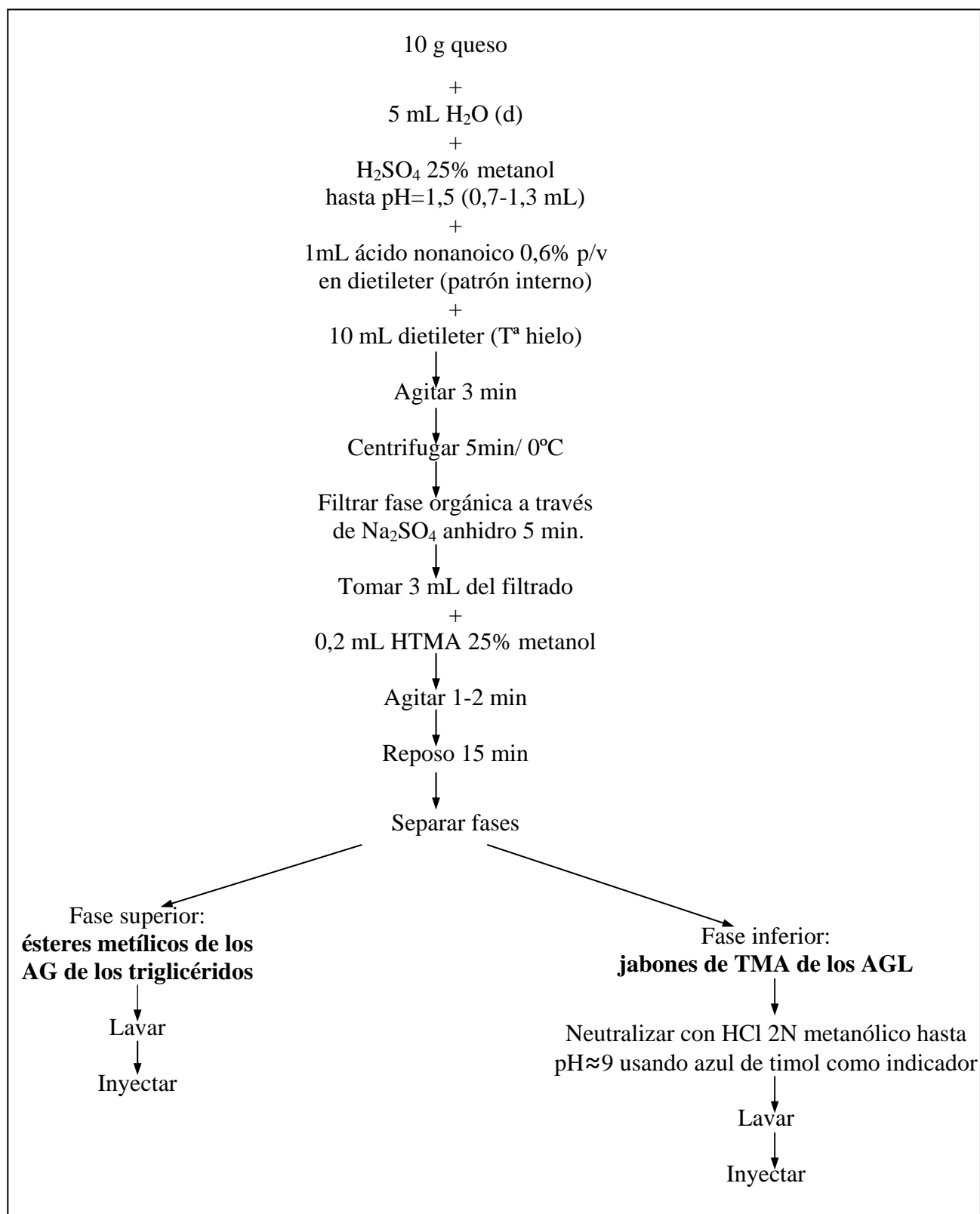


Figura 3.1: Método de extracción de las muestras para el análisis cromatográfico

Se realizaron dos extracciones por cada muestra, y cada una de estas se inyectó por duplicado en el cromatógrafo.

3.2.3. Análisis por cromatografía de gases

El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer modelo 8700, equipado con un inyector PTV y un detector de ionización de llama. La columna empleada fue una HP-5 de metilsilicona, de longitud, 30 m, diámetro, 0,25 mm y espesor o diámetro interno, 0,25 μm .

Con el objetivo de optimizar el análisis se ensayaron distintas condiciones cromatográficas (temperatura del inyector, volumen de inyección, split, splitless y programa de temperaturas en la columna), hasta obtener un cromatograma con una adecuada resolución de los picos. Las condiciones cromatográficas definitivas fueron:

- Programa de temperaturas de la columna: 60 °C durante 3 min, posteriormente una rampa de 8 °C/min hasta alcanzar 230 °C, mantenimiento 5 min.
- T^a inyector: 300 °C
- T^a detector: 280 °C
- Gas portador: N₂; presión en cabeza de columna: 19 psi.
- Vol. de inyección: 0,1 μL en splitless 0,05 min.
- Relación de split: 1:25

La identificación de los ácidos grasos se hizo por comparación con los tiempos de retención obtenidos al inyectar sustancias patrón de los siguientes ácidos grasos: C_{4:0} C_{6:0}, C_{8:0} C_{10:0}, C_{12:0}, C_{14:0}, C_{16:0}, C_{18:0} y C_{18:1}, todos de pureza > 99% por CG (Sigma-Aldrich). Estos ácidos grasos patrón fueron sometidos al mismo tratamiento de metilación que las muestras con HTMA.

El análisis cuantitativo de los ácidos grasos se realizó utilizando rectas de calibrado preparadas con concentraciones conocidas de las sustancias patrón anteriormente citadas. Para ello se preparó una disolución madre en eter etílico conteniendo los patrones de los

ácidos grasos anteriormente citados, en las concentraciones indicadas en la Tabla 3.1. Para la preparación de esta disolución madre se tomó como referencia la composición en AGL de una muestra de queso de 2 meses de maduración (Juárez *et al.*, 1992), con el fin de que los compuestos estuviesen en proporciones similares a las que se encuentran realmente en un queso, y se preparó 10 veces más concentrada, con el objetivo de realizar distintas diluciones y obtener varios puntos para las rectas de calibrado. De nuevo, estas disoluciones patrón fueron sometidas al mismo proceso de extracción y metilación que la muestra (Ver Figura 3.1).

Tabla 3.1: Disolución madre de ácidos grasos patrón preparada en dietiléter

| Compuesto | Tiempo de retención (min.) | Concentración en AGL (mg/Kg) | % |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|-------|
| C _{4:0} | 2,15 | 4.290 | 5,42 |
| C _{6:0} | 5,40 | 4.570 | 5,77 |
| C _{8:0} | 10,03 | 6.090 | 7,69 |
| C _{10:0} | 14,15 | 7.010 | 8,85 |
| C _{12:0} | 17,74 | 3.950 | 4,99 |
| C _{14:0} | 20,97 | 6.860 | 8,66 |
| C _{16:0} | 23,95 | 19.750 | 24,94 |
| C _{18:0} | 27,00 | 6.760 | 8,54 |
| C _{18:1} | 26,63 | 19.900 | 25,13 |

La Figura 3.2 muestra el cromatograma obtenido para una de las diluciones preparadas a partir de la disolución madre. Las rectas de calibrado para cada ácido graso aparecen en la Tabla 3.2, junto con el coeficiente de correlación R^2 . Además se muestra como ejemplo, un cromatograma correspondiente al análisis de los AGL de una de las muestras de quesos Manchegos (Figura 3.3).

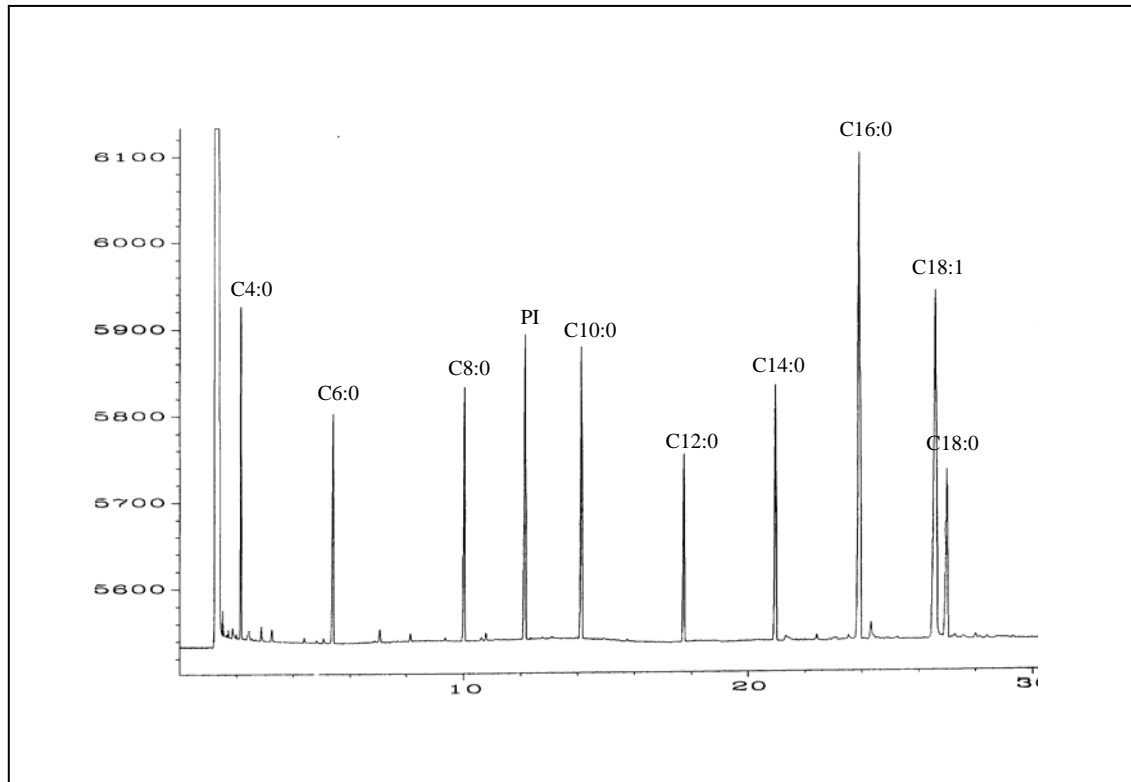


Figura 3.2: Cromatograma de la mezcla patrón de ácidos grasos

Tabla 3.2: Rectas de calibrado para cada uno de los ácidos grasos analizados

| Ácido graso | Ecuación de la recta | R ² |
|--------------------------------|-------------------------|----------------|
| Butírico (C _{4:0}) | $y = 0,0233 + 0,800 x$ | 0,980 |
| Caproico (C _{6:0}) | $y = 0,0189 + 0,943 x$ | 0,997 |
| Caprílico (C _{8:0}) | $y = 0,0191 + 1,000 x$ | 0,999 |
| Cáprico (C _{10:0}) | $y = 0,0251 + 1,040 x$ | 0,999 |
| Laúrico (C _{12:0}) | $y = -0,0457 + 1,130 x$ | 0,998 |
| Mirístico (C _{14:0}) | $y = -0,1590 + 1,170 x$ | 0,994 |
| Palmítico (C _{16:0}) | $y = -1,0200 + 1,260 x$ | 0,998 |
| Estearico (C _{18:0}) | $y = -0,4520 + 1,310 x$ | 0,998 |
| Oleico (C _{18:1}) | $y = -1,1500 + 1,200 x$ | 0,999 |

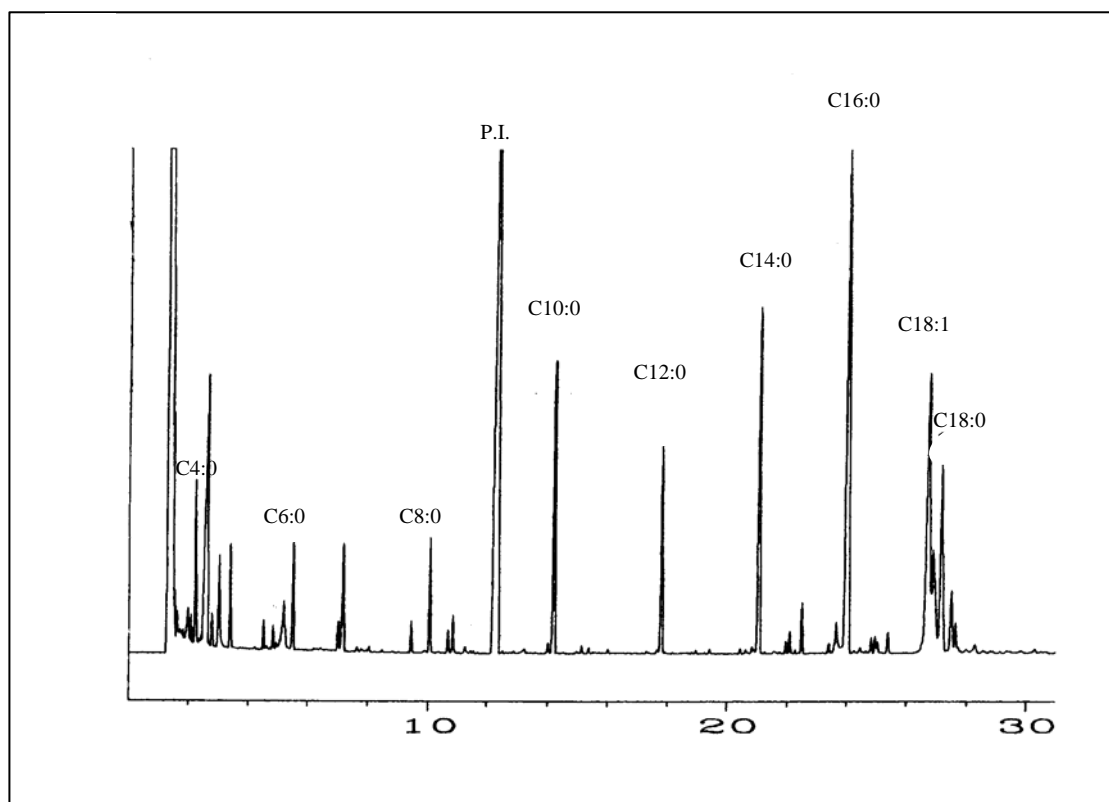


Figura 3.3: Cromatograma de los ácidos grasos libres de una muestra de queso Manchego de 15 días

3.2.4. Tratamiento estadístico

Se aplicó el análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, utilizando el test de Student-Newman-Keuls, y el análisis de Componentes Principales (ACP), utilizando el programa estadístico SPSS para Windows, Versión 9.0.1.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Contenido en ácidos grasos libres

La Tabla 3.3 muestra las concentraciones medias de AGL individuales de los quesos Manchegos elaborados en primavera, otoño e invierno, a los diferentes tiempos de maduración estudiados. En esta tabla también se muestran los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, considerando como factor el tiempo de maduración.

En general, la lipólisis experimentada por las muestras de queso Manchego analizadas no fue muy intensa, tal y como era de esperar, debido posiblemente a la escasa actividad lipolítica de las bacterias lácticas (Ordóñez, 1987).

Los AGL encontrados en mayor proporción en las muestras de queso, independientemente del tiempo de maduración y de la estación de fabricación, fueron los ácidos palmítico ($C_{16:0}$) y oleico ($C_{18:1}$), con porcentajes individuales entre el 28 al 34% del total de AGL. Los ácidos mirístico ($C_{14:0}$) y esteárico ($C_{18:0}$) aparecieron en proporciones intermedias (entre el 9 y el 12%). El ácido butírico ($C_{4:0}$) fue el AGL de cadena corta presente en mayor proporción (del 1 al 7%). Esta distribución se dio para las tres estaciones de elaboración estudiadas y se mantuvo a lo largo del período de maduración. Aunque los AGL de cadena corta se encontraron, en general, en bajas concentraciones, hay que destacar que son muy importantes en cuanto a que contribuyen directamente al aroma del queso (Nájera *et al.*, 1993; Macedo y Malcata, 1996).

Estos resultados son coincidentes con los encontrados en la leche de oveja por Olmedo y Coll-Hellín (1976) y Gatusso y Fazio (1980), quienes comprobaron que los ácidos palmítico y oleico fueron los AGL predominantes en la leche, mientras que el caproico y el caprílico estaban en bajas concentraciones. Otros autores hallaron resultados similares para quesos elaborados con leche de oveja. Así, en los quesos Roncal e Idiazábal, el butírico y el palmítico fueron los AGL de cadena corta y larga encontrados en mayor concentración, respectivamente (Gómez *et al.*, 1987; Nájera *et al.*, 1994).

En queso Manchego conservado en aceite de oliva, los AGL mayoritarios también fueron el oleico y el palmítico, seguidos por el mirístico, y por último, el ácido butírico (De la Fuente *et al.*, 1993). En este caso, las concentraciones en AGL fueron mucho mayores que las cuantificadas en el presente estudio, sumando un total de AGL de 32.404 mg/Kg. Esto es debido al largo período de maduración experimentado por este tipo de queso, ya que la inmersión en aceite permite su conservación durante largos períodos de tiempo (hasta dos años).

También Macedo y Malcata (1996) obtuvieron en queso Serra (elaborado con leche cruda de oveja) un perfil de AGL mayoritarios similar al obtenido en este trabajo, con la excepción de que el AGL de cadena media predominante fue el cáprico.

En cuanto a la concentración total de AGL de los quesos por estaciones de fabricación, el lote de primavera seguido por el de invierno fueron, en general, los que presentaron las mayores concentraciones durante la maduración (3802 y 3616 mg/Kg a los 150 días de maduración, respectivamente), mientras que fueron menores para el lote de otoño (2547 mg/Kg, al final de la maduración). Si se considera el contenido en grasa de las leches de partida (6,3, 7,6 y 6,5 g/100 mL leche, para los lotes de primavera, otoño e invierno, respectivamente), parece ser que éste no afecte de una forma significativa al grado de lipólisis experimentada por los quesos durante la maduración.

Macedo y Malcata (1996) estudiaron la concentración de AGL en queso Serra elaborado con leche cruda de oveja a lo largo de la maduración y en tres épocas distintas del año (Noviembre, Febrero y Mayo). Al final del período de maduración (35 días) los quesos elaborados en Mayo presentaron, en general, contenidos de AGL significativamente superiores a los de los quesos elaborados en Noviembre y Febrero. Estos autores concluyeron que esto fue debido a los mayores valores de pH y a las temperaturas de maduración más elevadas que se dieron durante el mes de Mayo (esta variedad de queso se madura a temperatura ambiente), lo cual afecta a la actividad de las lipasas. Por otro lado, Virgili *et al.* (1994), en un estudio realizado sobre el queso Parmesano-Reggiano elaborado en las cuatro estaciones del año, encontraron que los quesos elaborados en invierno fueron los que presentaron un mayor contenido en AGL.

Tabla 3.3: Concentraciones medias (mg/Kg) y desviación standard de los AGL en queso Manchego a lo largo de la maduración elaborados en tres estaciones distintas del año (1ª fila: *primavera*; 2ª fila: *otoño*; 3ª fila: *invierno*).

| Ácido graso | Tiempo de maduración (días) | | | | | | |
|-------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | 15 | 30 | 45 | 60 | 90 | 120 | 150 |
| C _{4:0} | 26 ^a ±3 | 26 ^a ±9 | 38 ^{a,b} ±4 | 31 ^a ±10 | 56 ^b ±6 | 47 ^{a,b} ±5 | 85 ^c ±24 |
| | 60 ^a ±2 | 61 ^a ±0 | 71 ^a ±4 | 108 ^b ±18 | 118 ^b ±23 | 166 ^c ±11 | 149 ^{b,c} ±27 |
| | 80 ^a ±14 | 65 ^a ±4 | 109 ^b ±8 | 176 ^c ±37 | 179 ^c ±13 | 206 ^d ±15 | 252 ^e ±11 |
| C _{6:0} | 20 ^a ±0 | 22 ^a ±5 | 26 ^a ±5 | 19 ^a ±3 | 38 ^b ±3 | 33 ^b ±1 | 58 ^c ±5 |
| | 17 ^a ±1 | 17 ^a ±0 | 29 ^{a,b} ±1 | 41 ^{b,c} ±9 | 43 ^{b,c} ±10 | 71 ^d ±2 | 52 ^c ±8 |
| | 48 ^{a,b} ±11 | 31 ^a ±4 | 56 ^{a,b} ±4 | 79 ^b ±25 | 74 ^b ±8 | 106 ^c ±8 | 133 ^d ±14 |
| C _{8:0} | 26 ^{a,b} ±4 | 37 ^{b,c} ±3 | 32 ^{a,b} ±7 | 21 ^a ±4 | 44 ^c ±6 | 36 ^{b,c} ±3 | 69 ^d ±8 |
| | 17 ^a ±3 | 17 ^a ±3 | 29 ^b ±3 | 33 ^b ±5 | 30 ^b ±5 | 59 ^c ±1 | 38 ^b ±5 |
| | 49 ^a ±11 | 38 ^a ±3 | 45 ^a ±2 | 74 ^b ±11 | 69 ^b ±10 | 87 ^c ±4 | 110 ^d ±10 |
| C _{10:0} | 128 ^{a,b} ±8 | 130 ^{a,b} ±23 | 115 ^{a,b} ±5 | 97 ^a ±14 | 171 ^c ±17 | 147 ^{b,c} ±5 | 232 ^d ±28 |
| | 114 ^a ±6 | 107 ^a ±3 | 142 ^b ±0 | 144 ^b ±16 | 136 ^b ±3 | 230 ^c ±9 | 156 ^b ±6 |
| | 182 ^a ±32 | 174 ^a ±11 | 158 ^a ±6 | 222 ^b ±11 | 222 ^b ±28 | 236 ^b ±14 | 318 ^c ±22 |
| C _{12:0} | 120 ^{a,b} ±3 | 118 ^{a,b} ±13 | 115 ^{a,b} ±8 | 102 ^a ±8 | 148 ^c ±12 | 137 ^{b,c} ±4 | 197 ^d ±20 |
| | 108 ^a ±5 | 105 ^a ±2 | 132 ^c ±0 | 115 ^a ±9 | 112 ^a ±8 | 173 ^{b,c} ±6 | 126 ^d ±7 |
| | 125 ^{a,b} ±16 | 140 ^{b,c} ±8 | 112 ^a ±4 | 150 ^c ±13 | 146 ^c ±17 | 152 ^c ±10 | 202 ^d ±7 |
| C _{14:0} | 285 ^a ±1 | 275 ^a ±27 | 271 ^a ±24 | 250 ^a ±17 | 287 ^a ±141 | 325 ^a ±11 | 453 ^b ±49 |
| | 259 ^a ±14 | 257 ^a ±5 | 311 ^b ±3 | 266 ^a ±13 | 256 ^a ±26 | 386 ^c ±12 | 299 ^{a,b} ±21 |
| | 275 ^a ±31 | 333 ^b ±20 | 256 ^a ±10 | 322 ^b ±34 | 330 ^b ±44 | 338 ^b ±27 | 443 ^c ±12 |
| C _{16:0} | 881 ^{a,b} ±9 | 873 ^{a,b} ±49 | 869 ^{a,b} ±59 | 825 ^a ±36 | 1008 ^c ±41 | 953 ^{b,c} ±19 | 1176 ^d ±96 |
| | 701 ^{a,b} ±18 | 686 ^{a,b} ±19 | 788 ^c ±3 | 683 ^{a,b} ±26 | 670 ^a ±57 | 944 ^c ±35 | 766 ^{b,c} ±40 |
| | 690 ^{a,b} ±59 | 844 ^c ±51 | 656 ^a ±26 | 775 ^{a,b,c} ±8 | 795 ^{b,c} ±10 | 779 ^{a,b,c} ±4 | 994 ^d ±35 |
| C _{18:0} | 320 ^{a,b} ±5 | 324 ^{a,b} ±35 | 326 ^{a,b} ±20 | 308 ^a ±12 | 357 ^b ±12 | 335 ^{a,b} ±8 | 405 ^c ±32 |
| | 227 ^{a,b} ±7 | 227 ^{a,b} ±5 | 251 ^b ±3 | 217 ^a ±9 | 217 ^a ±23 | 279 ^c ±4 | 244 ^{a,b} ±10 |
| | 255 ^a ±36 | 330 ^b ±25 | 252 ^a ±11 | 333 ^b ±27 | 305 ^{a,b} ±52 | 308 ^{a,b} ±22 | 348 ^b ±14 |
| C _{18:1} | 891 ^{a,b} ±29 | 844 ^{a,b} ±35 | 881 ^{a,b} ±58 | 837 ^a ±31 | 964 ^b ±54 | 967 ^b ±20 | 1153 ^c ±10 |
| | 669 ^{a,b} ±21 | 701 ^b ±1 | 842 ^c ±21 | 622 ^a ±22 | 609 ^a ±43 | 814 ^c ±31 | 716 ^b ±41 |
| | 652 ^{a,b} ±55 | 826 ^d ±46 | 605 ^a ±24 | 761 ^{c,d} ±61 | 686 ^{a,b,c} ±7 | 739 ^{b,c,d} ±6 | 816 ^c ±16 |

^{a,b,c}: Medias en la misma **fila** con superíndices distintos son significativamente diferentes entre sí según el test de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

3.3.2. Estudio de la evolución de los AGL con el tiempo de maduración

El análisis de la varianza de los AGL individuales, considerando como factor el tiempo de maduración, mostró que la concentración de los AGL varió con el tiempo de maduración ($p < 0,05$; ver Tabla 3.3), si bien el incremento no fue progresivo en todos los casos. Contarini y Topino (1995) encontraron este mismo efecto en queso Gorgonzola (queso de vena azul italiano), sin embargo, estos resultados difieren de los encontrados por Juárez *et al.* (1983) en queso de Cabrales, en el que el contenido en AGL disminuía a lo largo de la maduración. Esto podría explicarse por el hecho de que los AGL aumentan con el tiempo de maduración según va teniendo lugar la lipólisis, pero en quesos con un alto grado de lipólisis (debido a largos períodos de maduración, a las lipasas contenidas en las pastas de cuajo sin purificar o a las lipasas fúngicas) los AGL pueden ser convertidos en otros compuestos tales como metilcetonas, alcoholes, lactonas, aldehídos, etc. (Rafecas *et al.*, 1985), o también pueden ser reincorporados a los triglicéridos.

Los AGL que más aumentaron durante la maduración fueron los de cadena corta ($C_{4:0}$, $C_{6:0}$ y $C_{8:0}$), que en algunos casos llegaron a triplicar su concentración al final de la maduración. Los AGL de cadena media ($C_{10:0}$, $C_{12:0}$ y $C_{14:0}$) experimentaron aumentos moderados, mientras que los menores incrementos fueron para los AGL de cadena larga ($C_{16:0}$, $C_{18:0}$ y $C_{18:1}$). El mayor incremento de la concentración de AGL de cadena corta con la maduración podría explicarse por el hecho de que las lipasas (fundamentalmente procedentes de la leche y de los microorganismos) que participan en la maduración del queso, son sn-1,3-específicas e hidrolizan preferentemente residuos de ácidos grasos de cadena corta, por ser éstos los que se encuentran esterificados predominantemente en las posiciones 1 y 3 del triglicérido (De la Fuente *et al.*, 1993) y por otro lado, los ácidos de cadena larga son más susceptibles de reincorporarse a los triglicéridos mediante la síntesis de ésteres catalizada por lipasas (Sousa y Malcata, 1997). Macedo y Malcata (1996) y Sousa *et al.* (1997) también encontraron en queso Serra que los ácidos grasos de cadena corta fueron los que experimentaron mayores incrementos a lo largo de la maduración.

Con el objetivo de conocer si existía alguna relación lineal entre la concentración de AGL y el tiempo de maduración, se aplicó el análisis de regresión lineal con el tiempo a cada AGL por separado. Las Tablas 3.4, 3.5 y 3.6 muestran los resultados obtenidos para

Tabla 3.4: Regresión lineal entre la concentración de AGL y el tiempo de maduración:
 $y=mx+b$, para los quesos de **PRIMAVERA**

| | R² | m | b |
|-------------------------|----------------------|----------|----------|
| C_{4:0} | 0,806 | 0,261 | 21,62 |
| C_{6:0} | 0,772 | 0,26 | 12,58 |
| C_{8:0} | 0,596 | 0,243 | 19,99 |
| C_{10:0} | 0,613 | 0,707 | 94,09 |
| C_{12:0} | 0,678 | 0,529 | 95,31 |
| C_{14:0} | 0,634 | 1,106 | 225,98 |
| C_{16:0} | 0,699 | 2,038 | 792,11 |
| C_{18:0} | 0,639 | 0,529 | 300,53 |
| C_{18:1} | 0,749 | 1,922 | 793,56 |

Tabla 3.5: Regresión lineal entre la concentración de AGL y el tiempo de maduración:
 $y=mx+b$, para los quesos de **OTOÑO**

| | R² | m | b |
|-------------------------|----------------------|----------|----------|
| C_{4:0} | 0,884 | 0,815 | 45,32 |
| C_{6:0} | 0,777 | 0,349 | 13,01 |
| C_{8:0} | 0,609 | 0,227 | 15,37 |
| C_{10:0} | 0,470 | 0,560 | 105,90 |
| C_{12:0} | 0,321 | 0,269 | 104,75 |
| C_{14:0} | 0,293 | 0,520 | 252,52 |
| C_{16:0} | 0,250 | 0,986 | 676,40 |
| C_{18:0} | 0,218 | 0,211 | 221,89 |
| C_{18:1} | 0,022 | 0,267 | 690,75 |

Tabla 3.6: Regresión lineal entre la concentración de AGL y el tiempo de maduración:
 $y=mx+b$, para los quesos de **INVIERNO**

| | R² | m | b |
|-------------------------|----------------------|----------|----------|
| C_{4:0} | 0,905 | 1,337 | 55,04 |
| C_{6:0} | 0,900 | 0,671 | 26,23 |
| C_{8:0} | 0,875 | 0,487 | 31,97 |
| C_{10:0} | 0,824 | 0,991 | 144,54 |
| C_{12:0} | 0,714 | 0,487 | 111,63 |
| C_{14:0} | 0,674 | 0,997 | 256,23 |
| C_{16:0} | 0,491 | 1,565 | 676,81 |
| C_{18:0} | 0,382 | 0,480 | 271,29 |
| C_{18:1} | 0,208 | 0,784 | 674,33 |

cada uno de los tres lotes de quesos estudiados, respectivamente. En general, los coeficientes de correlación (R^2) fueron mayores para los AGL de cadena corta. Así para los lotes de primavera y otoño se obtuvo un valor del R^2 para el $C_{4:0}$ de 0,806 y 0,884, respectivamente, y para el lote de invierno, los valores R^2 fueron superiores a 0,800 para los ácidos $C_{4:0}$, $C_{6:0}$, $C_{8:0}$ y $C_{10:0}$ ($R^2=0,905$, $0,900$, $0,875$ y $0,824$, respectivamente). Por todo esto, y como muchos autores han sugerido (De la Fuente *et al.* 1993; Macedo y Malcata, 1996; Sousa *et al.*, 1997; Sousa y Malcata, 1997), esta fracción de los AGL (AGL de cadena corta) podría ser utilizada como un índice de la maduración de los quesos. Sousa y Malcata (1997) sugirieron que, para el estudio de la lipólisis en quesos a lo largo de la maduración, sería mucho más útil y daría más información el índice de liberación de AGL (calculado como el cociente entre la cantidad de ácidos grasos liberados en un período de tiempo determinado y dicho tiempo), más que las medidas absolutas de las concentraciones de AGL en un momento concreto de la maduración.

3.3.3. Estudio de la concentración de los AGL según la época de elaboración (primavera, otoño e invierno)

A continuación se aplicó el análisis de la varianza considerando como factor la estación de elaboración. En las Figuras 3.4, 3.5 y 3.6 se representa en forma de histogramas las concentraciones, en mg/Kg, de AGL individuales para los tres lotes de quesos, y con una letra pequeña sobre cada barra, por grupos de tres, los resultados del test de comparación de medias (test de S-N-K). Según se observa en la Figura 3.4, las muestras de quesos elaboradas en invierno presentaron unas concentraciones de AGL de cadena corta ($C_{4:0}$, $C_{6:0}$ y $C_{8:0}$) significativamente mayores que los otros dos lotes (primavera y otoño). Cabe destacar que, en el caso del ácido butírico ($C_{4:0}$) existieron diferencias significativas entre los tres lotes de quesos para todas las fechas de maduración estudiadas (excepto a los 30 días de maduración). El ácido caproico ($C_{6:0}$) presentó unas concentraciones similares en los lotes fabricados en primavera y en otoño (a excepción de los 120 días de maduración), siendo en todos los casos inferiores a las del lote de invierno. Para el ácido caprílico ($C_{8:0}$) sólo se obtuvieron diferencias significativas entre los tres lotes de quesos en las muestras con mayores tiempos de maduración (90, 120 y 150 días). En el caso de los AGL de cadena media sólo se observaron diferencias significativas entre los tres lotes de quesos en

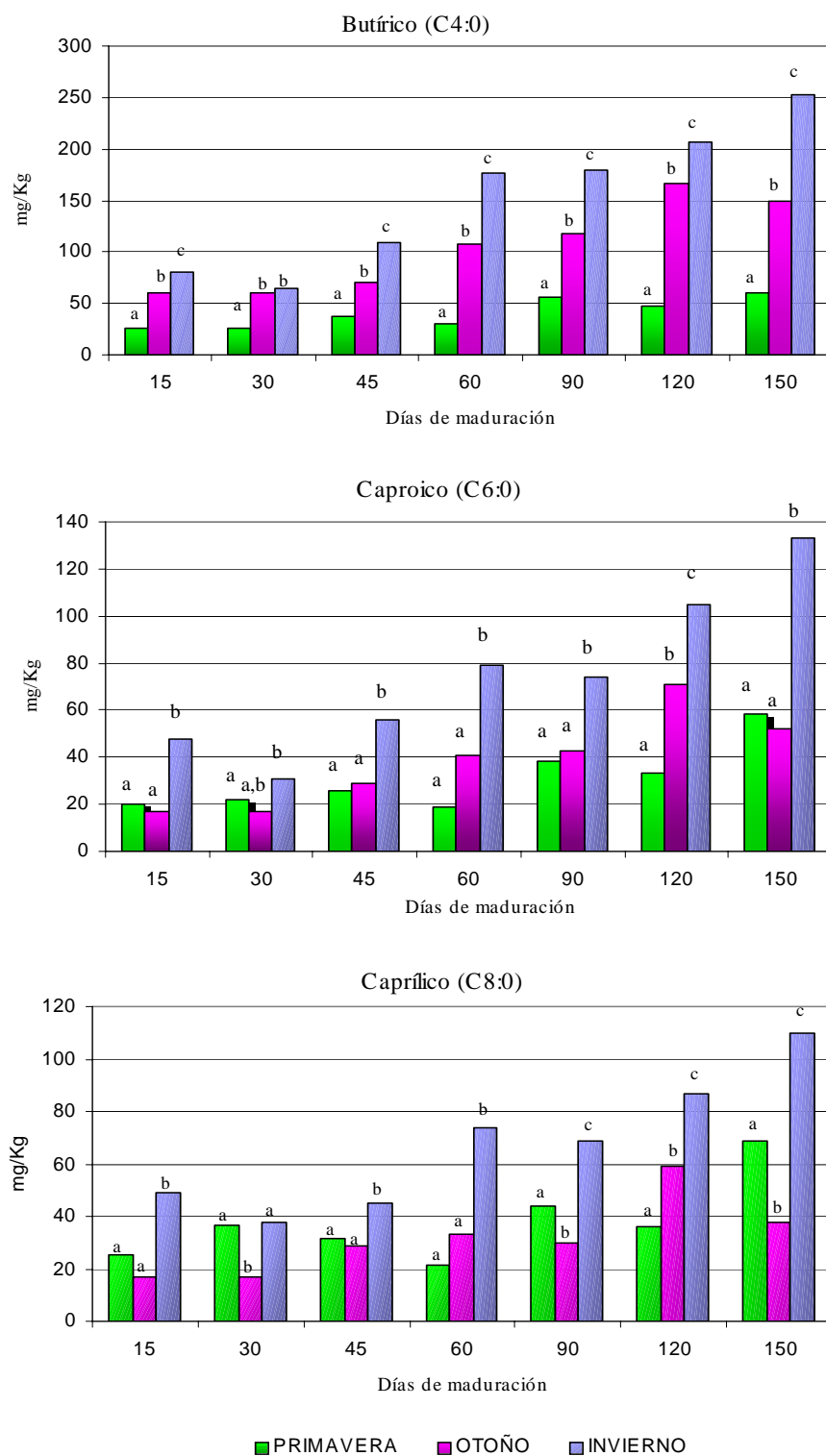


Figura 3.4: Concentraciones (mg/Kg) de los AGL C_{4:0}, C_{6:0} y C_{8:0} en quesos Manchegos elaborados en distintas estaciones del año a lo largo de la maduración

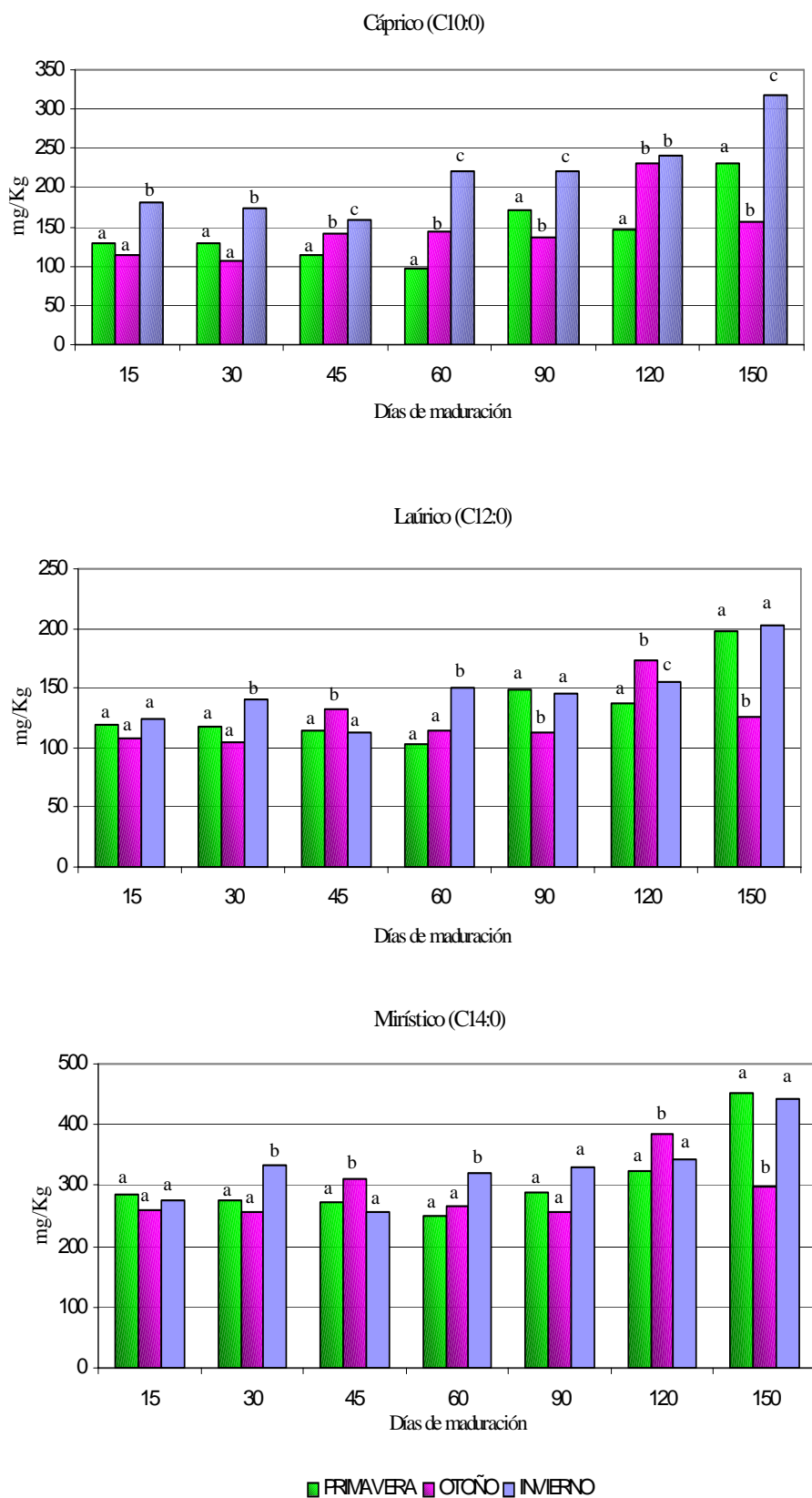


Figura 3.5: Concentraciones (mg/Kg) de los AGL $C_{10:0}$, $C_{12:0}$ y $C_{14:0}$ en quesos Manchegos elaborados en distintas estaciones del año a lo largo de la maduración

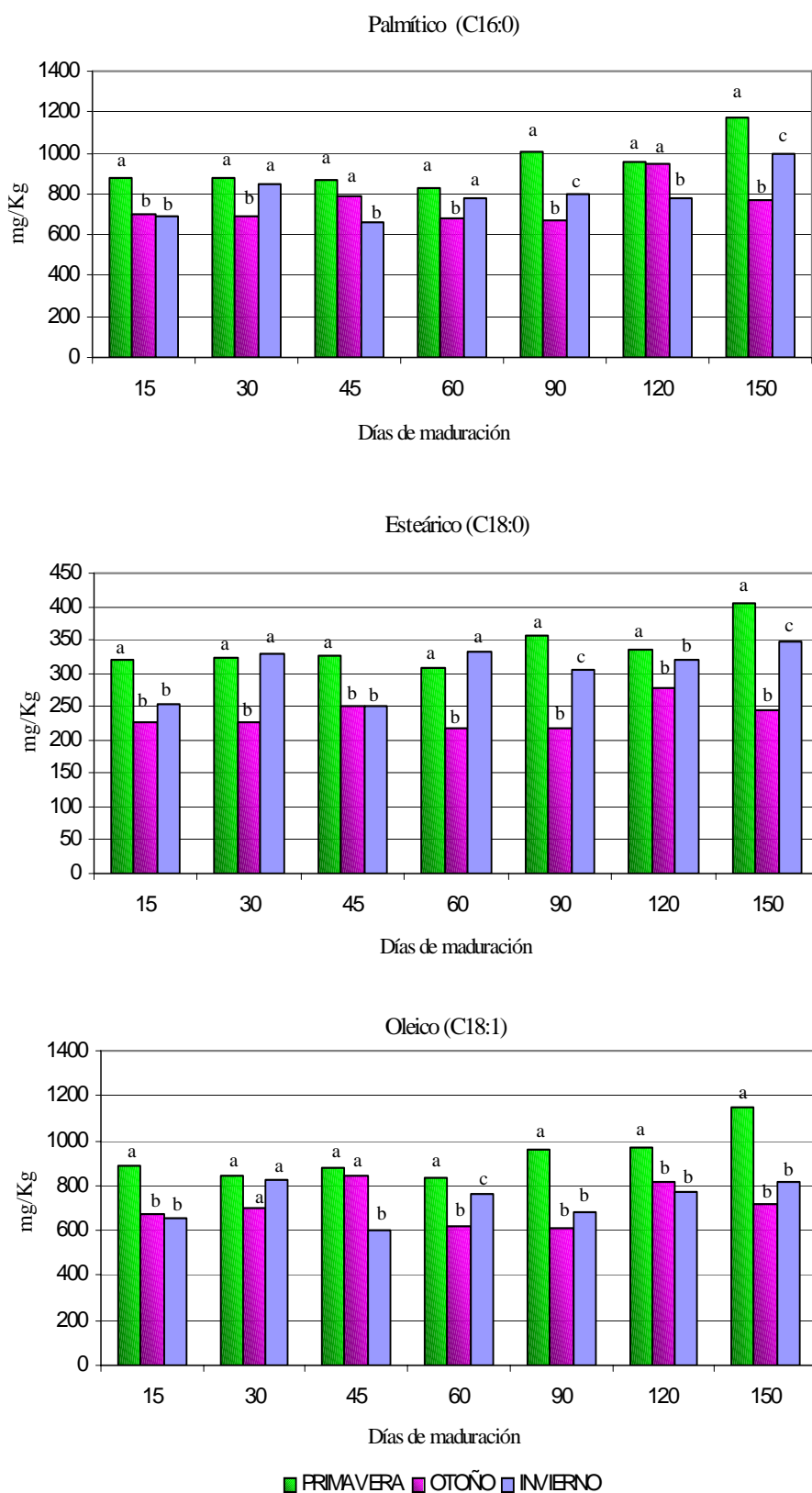


Figura 3.6: Concentraciones (mg/Kg) de los AGL $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ y $C_{18:1}$ en quesos Manchegos elaborados en distintas estaciones del año a lo largo de la maduración

algunos de los tiempos de maduración estudiados (Figura 3.5) y por último, los AGL de cadena larga (C_{16:0}-C_{18:1}) se encontraron en general, en concentraciones significativamente mayores en el lote de primavera respecto al resto de las muestras (Figura 3.6).

Posteriormente se aplicó el Análisis de Componentes Principales a los resultados de AGL obtenidos para las muestras de queso Manchego elaborados en primavera, otoño e invierno, por separado, con el objetivo de conocer cómo se distribuían las muestras según el tiempo de maduración, en base a su contenido en AGL. Las variables más correlacionadas con los dos primeros Componentes Principales y el porcentaje de varianza explicado por los mismos se muestra en las Tablas 3.7, 3.8 y 3.9, para los lotes de primavera, otoño e invierno, respectivamente. Las Figuras 3.7, 3.8 y 3.9 muestran la representación de las muestras en el plano definido por los CP 1 y CP 2, para los quesos de primavera, otoño e invierno, respectivamente.

En el caso de los quesos elaborados en primavera, los dos primeros componentes principales explicaron el 98,1% de la varianza total. Las variables más correlacionadas con ambos CP fueron los AGL mirístico (C_{14:0}), con el CP 1 y butírico (C_{4:0}), con el CP 2 (Tabla 3.7). Al representar el conjunto de las muestras en el plano definido por los CP 1 y 2 se obtuvo la distribución que se muestra en la Figura 3.7. Se observa que la muestra de 150 días de maduración aparece separada del resto, debido a su mayor concentración en los AGL mirístico y caprílico; el resto de muestras se distribuye a lo largo del CP 2 según su contenido en ácido butírico, siendo los quesos de 90, 120 y 150 días los que presentaron las mayores concentraciones de este ácido.

En el caso de las muestras de otoño, el CP 1 explicó el 82,1% de la varianza total, y las variables más correlacionadas con el mismo fueron los AGL de cadena corta (butírico, caproico y caprílico, ver Tabla 3.8). El CP 2 (16,2% de la varianza total) estuvo más correlacionado con los ácidos oleico y esteárico. Al representar las muestras en el plano definido por estos dos componentes principales se observa la existencia de dos grupos de muestras: en la parte positiva del CP 1 se encuentran las muestras de queso de 60, 90, 120 y 150 días de maduración, las cuales poseen los mayores contenidos en los

Tabla 3.7: Análisis de Componentes Principales aplicado a las concentraciones de AGL de las muestras de queso Manchego elaborados en **PRIMAVERA**

| Componente Principal | % Varianza explicada | % Varianza acumulada | Coeficientes y variables más correlacionadas con cada Componente Principal | |
|----------------------|----------------------|----------------------|--|-------|
| 1 | 94,5 | 94,5 | mirístico | 0,920 |
| | | | caprílico | 0,830 |
| 2 | 3,6 | 98,1 | butírico | 0,905 |

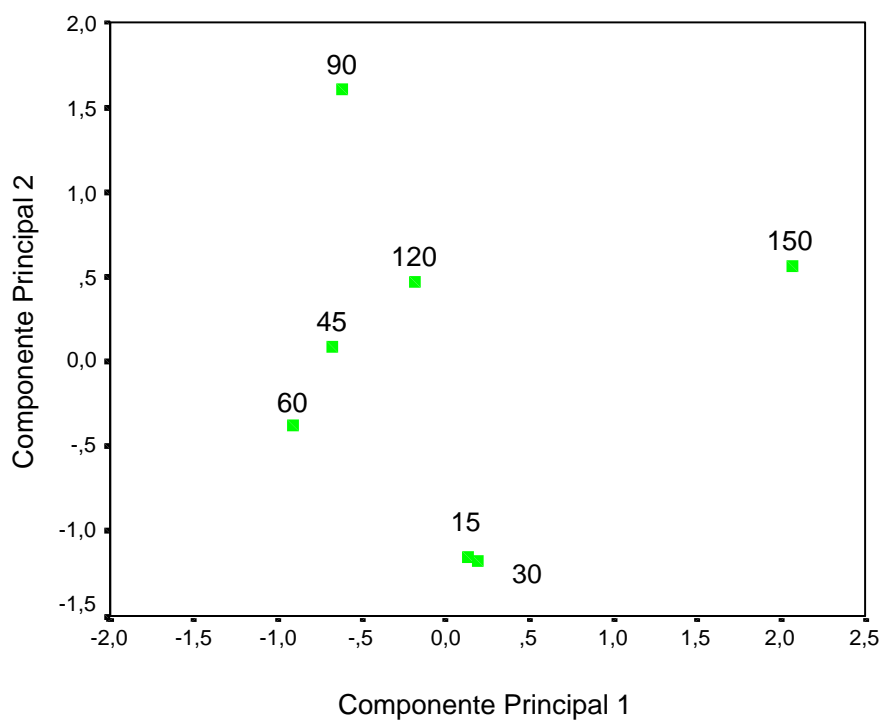


Figura 3.7: Representación de las muestras de **PRIMAVERA** en el plano definido por los dos componentes principales, obtenidos del ACP de los AGL.

Tabla 3.8: Análisis de Componentes Principales aplicado a las concentraciones de AGL de las muestras de queso Manchego elaborados en **OTOÑO**

| Componente Principal | % Varianza explicada | % Varianza acumulada | Coeficientes y variables más correlacionadas con cada Componente Principal | |
|----------------------|----------------------|----------------------|--|-------|
| 1 | 82,1 | 82,1 | butírico | 0,975 |
| | | | caproico | 0,964 |
| | | | caprílico | 0,888 |
| 2 | 16,2 | 98,3 | oleico | 0,980 |
| | | | esteárico | 0,905 |

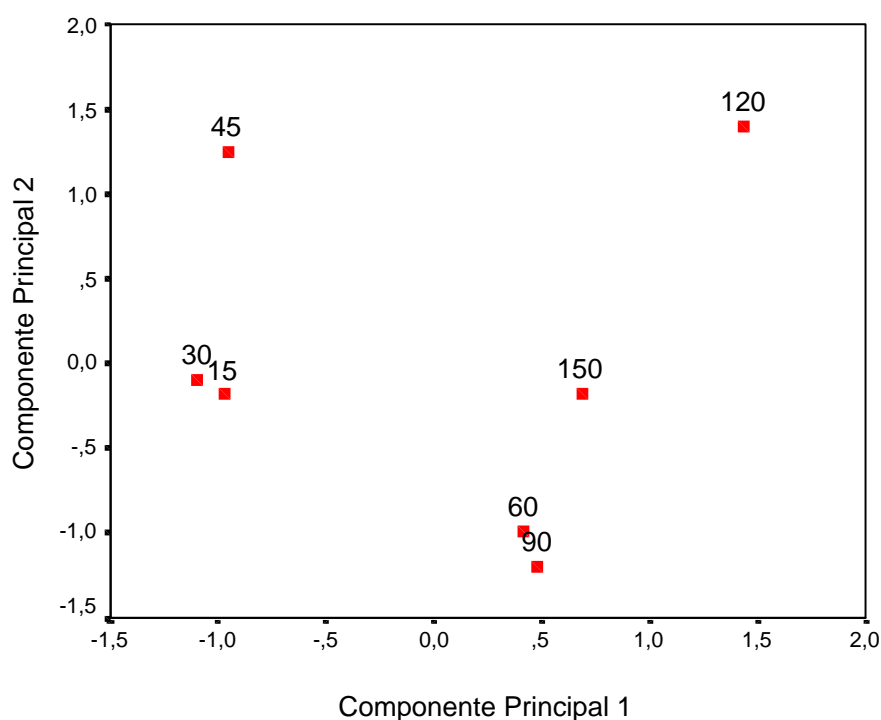


Figura 3.8: Representación de las muestras de **OTOÑO** en el plano definido por los dos componentes principales, obtenidos del ACP de los AGL.

Tabla 3.9: Análisis de Componentes Principales aplicado a las concentraciones de AGL de las muestras de queso Manchego elaborados en **INVIERNO**

| Componente Principal | % Varianza explicada | % Varianza acumulada | Variables más correlacionadas con cada Componente Principal | |
|----------------------|----------------------|----------------------|---|-------|
| 1 | 81,4 | 81,4 | caproico | 0,961 |
| | | | butírico | 0,944 |
| | | | caprílico | 0,936 |
| 2 | 14,7 | 96,1 | oleico | 0,965 |
| | | | esteárico | 0,895 |

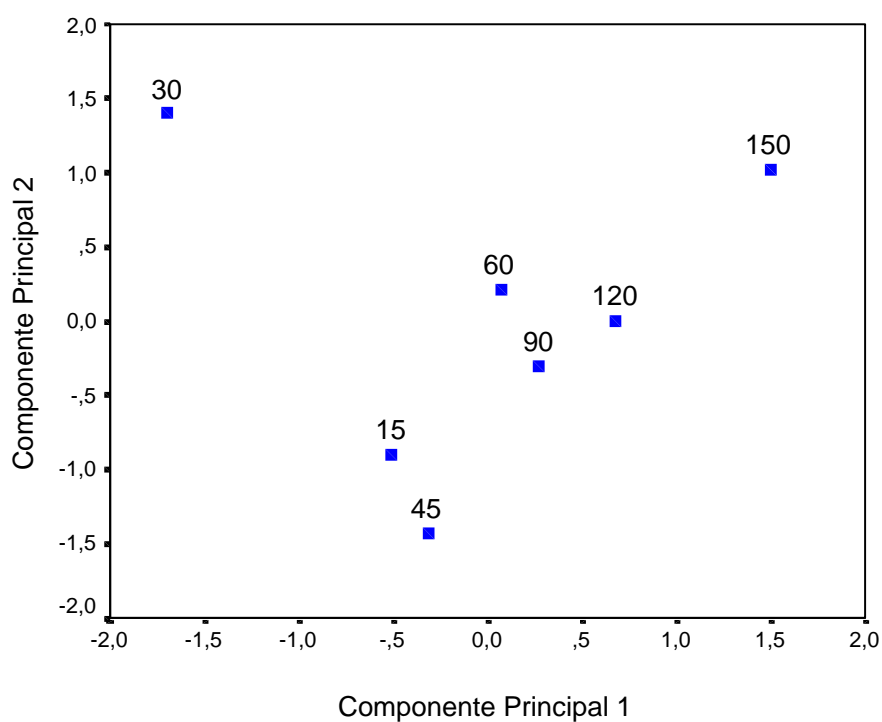


Figura 3.9: Representación de las muestras de **INVIERNO** en el plano definido por los dos componentes principales, obtenidos del ACP de los AGL.

AGL de cadena corta ($C_{4:0}$, $C_{6:0}$ y $C_{8:0}$) y en la parte negativa del mismo, las muestras menos maduras, con las menores concentraciones de estos AGL.

Para las muestras de invierno el CP 1 explicó el 81,4% de la varianza total, mientras que el CP 2 explicó el 14,7%. Las variables más correlacionadas con cada uno de los dos componentes principales fueron los mismos ácidos que en el caso de los quesos del lote de otoño (Tabla 3.9). La representación de las muestras en el plano formado por los ejes CP 1 y CP 2 muestra cómo, de nuevo, las muestras con un tiempo de maduración igual o superior a 60 días aparecen en la parte positiva del CP 1 (Figura 3.9), presentando mayores concentraciones en AGL de cadena corta que el resto de las muestras.

Por último se aplicó el ACP a los tres lotes de quesos en conjunto para comprobar si éstos se agrupaban por estaciones de fabricación. El porcentaje de varianza total explicada por los dos primeros CP fue del 94,4% (Tabla 3.10) y las variables más correlacionadas con los mismos fueron los AGL de cadena corta (con el CP 1) y los AGL de cadena larga (con el CP 2). Al representar las muestras en el plano definido por el CP 1 y el CP 2, se pueden considerar tres grupos, coincidentes con las tres estaciones de fabricación (Figura 3.10). En la parte superior izquierda de la figura, se encuentran las muestras de primavera, las cuales poseen un menor contenido en AGL de cadena corta que el resto de muestras y concentraciones relativamente altas de AGL de cadena larga; en la parte central aparecen las muestras elaboradas en otoño, con contenidos intermedios de AGL de cadena corta y concentraciones más bajas de AGL de cadena larga que los de primavera; muy próximas a las anteriores, situadas algo más hacia la derecha, se encuentran las muestras de invierno, con bajas cantidades de AGL de cadena larga y con las mayores concentraciones de AGL de cadena corta. Se puede comprobar que los resultados obtenidos del ACP coincidieron con los del ANOVA.

Considerando que todos los quesos fueron elaborados de la misma forma, con el mismo cultivo iniciador, con leche de oveja y madurados bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad relativa, se puede confirmar que las diferencias encontradas en la concentración en AGL entre los tres lotes estudiados se debe a la variación estacional de la

Tabla 3.10: Análisis de Componentes Principales aplicado a los AGL de muestras de queso Manchego fabricados en **PRIMAVERA**, **OTOÑO** e **INVIERNO**, con diferentes tiempos de maduración (15, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 días)

| Componente Principal | % Varianza explicada | % Varianza acumulada | Coeficientes y variables más correlacionadas con cada Componente Principal | |
|----------------------|----------------------|----------------------|--|-------|
| | | | | |
| 1 | 64,9 | 64,9 | caproico | 0,985 |
| | | | cáprico | 0,949 |
| | | | butírico | 0,948 |
| | | | caprílico | 0,941 |
| 2 | 29,5 | 94,4 | oleico | 0,980 |
| | | | palmítico | 0,965 |
| | | | esteárico | 0,894 |

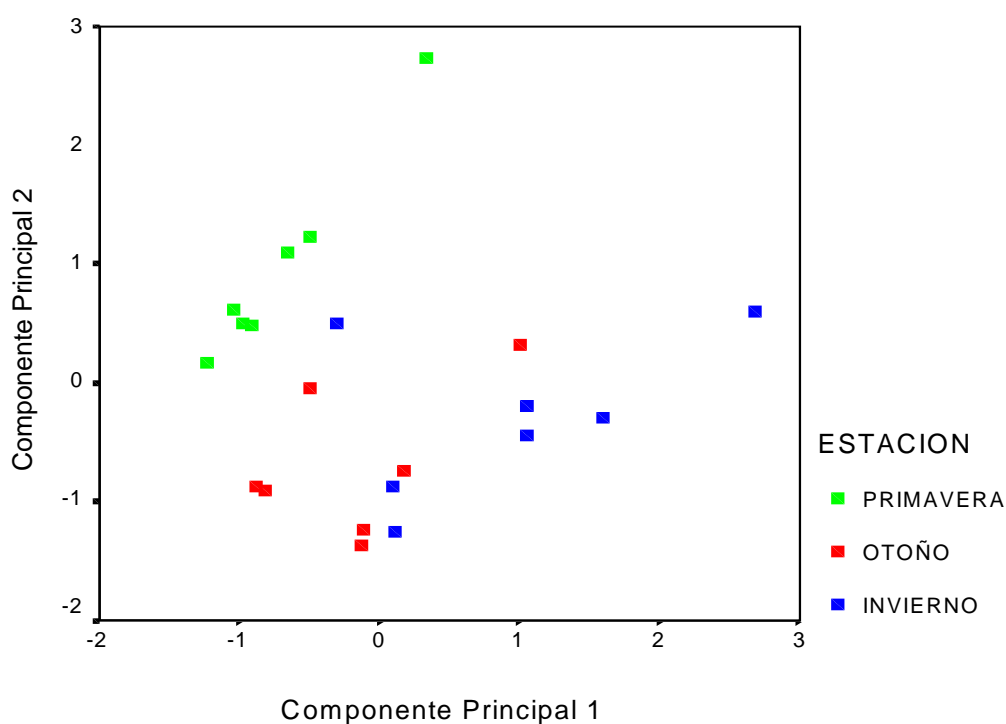


Figura 3.10: Representación de las muestras de **PRIMAVERA**, **OTOÑO** e **INVIERNO** en el plano definido por los dos componentes principales, obtenidos del ACP de los AGL.

leche de partida, la cual varía como se ha comentado anteriormente, con la alimentación del animal, su estado fisiológico, la edad, etc.

Los resultados encontrados en el presente trabajo ponen de manifiesto que la composición en AGL de quesos elaborados en distintas épocas del año varía fundamentalmente con respecto a la concentración de AGL de cadena corta y larga; esta variación no es muy acusada, puesto que en todos los estadíos de maduración estudiados cada lote de quesos mostró una composición relativa o un perfil en AGL similar, típico de los quesos de oveja. Sin embargo, las pequeñas variaciones observadas entre quesos elaborados en distintas estaciones del año se han de tener en cuenta, sobre todo las referentes a la concentración en AGL de cadena corta, por ser éstos los que contribuyen de una manera más directa al sabor y al aroma de los quesos.

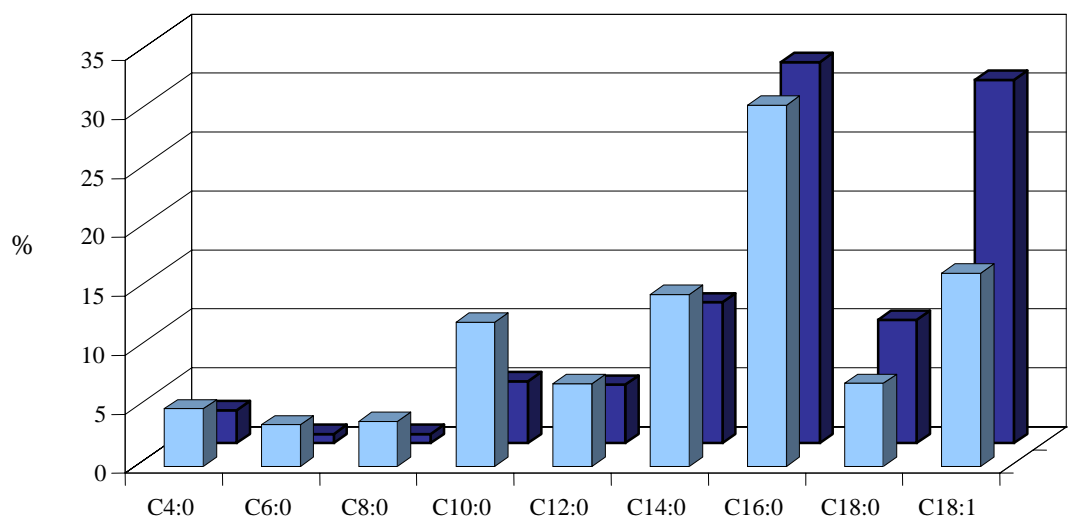
3.3.4. Contenido en ácidos grasos de la fracción triglicérica

Con el objetivo de profundizar en el estudio de los ácidos grasos presentes en el queso Manchego y debido a que el método utilizado en la extracción de los AGL permite a la vez obtener la fracción de ácidos grasos esterificados en los triglicéridos, se procedió al estudio de los mismos en los quesos elaborados en otoño e invierno. Las Figuras 3.11 y 3.12 muestran la comparación de los porcentajes de ácidos grasos en la fracción de los AGL y en la de los triglicéridos para los quesos Manchegos al inicio (15 días) y al final de la maduración (150 días), elaborados en otoño e invierno, respectivamente.

En general, el perfil de ácidos grasos de la fracción triglicérica para los quesos elaborados en otoño fue similar al de la fracción de los AGL (Figura 3.11). Los ácidos grasos mayoritarios, según la longitud de la cadena hidrocarbonada, fueron de nuevo el butírico (cadena corta), el mirístico (cadena media) y el palmítico (cadena larga).

Si se compara el contenido en ácidos grasos de ambas fracciones, se observa que, al inicio del período de maduración, los ácidos grasos de cadena larga presentaron unos porcentajes considerablemente mayores en la fracción de AGL que en la de los triglicéridos.

A)



B)

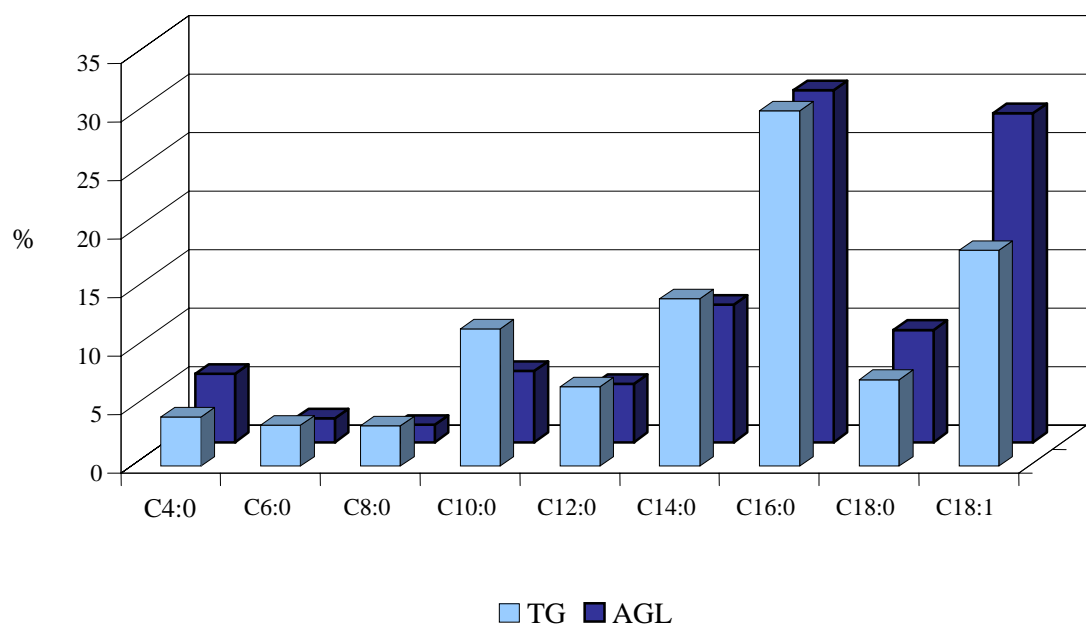
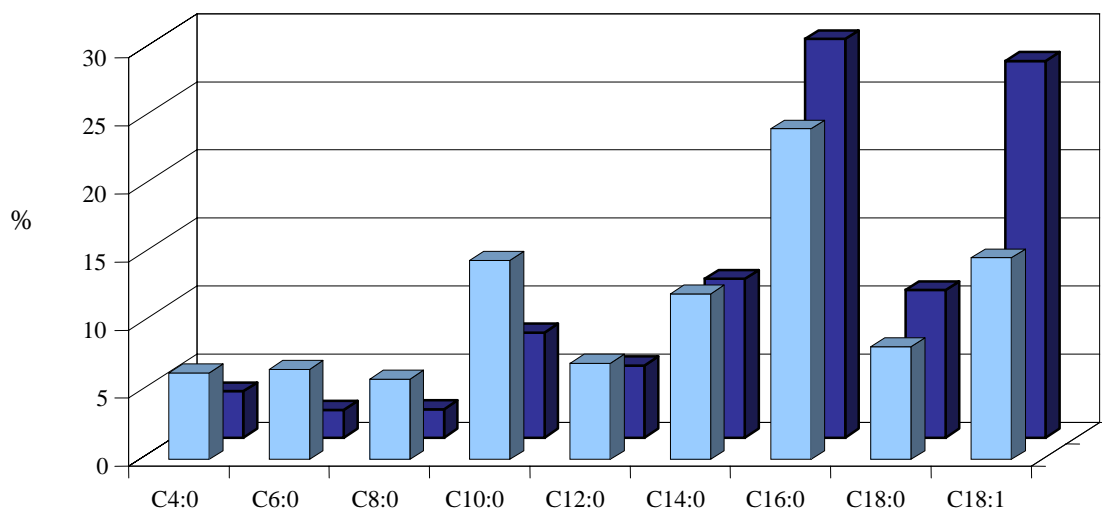


Figura 3.11: Comparación de los porcentajes de ácidos grasos en la fracción triglicéridica y la de los AGL para los quesos elaborados en **OTOÑO**. A) 15 días de maduración; B) 150 días de maduración

A)



B)

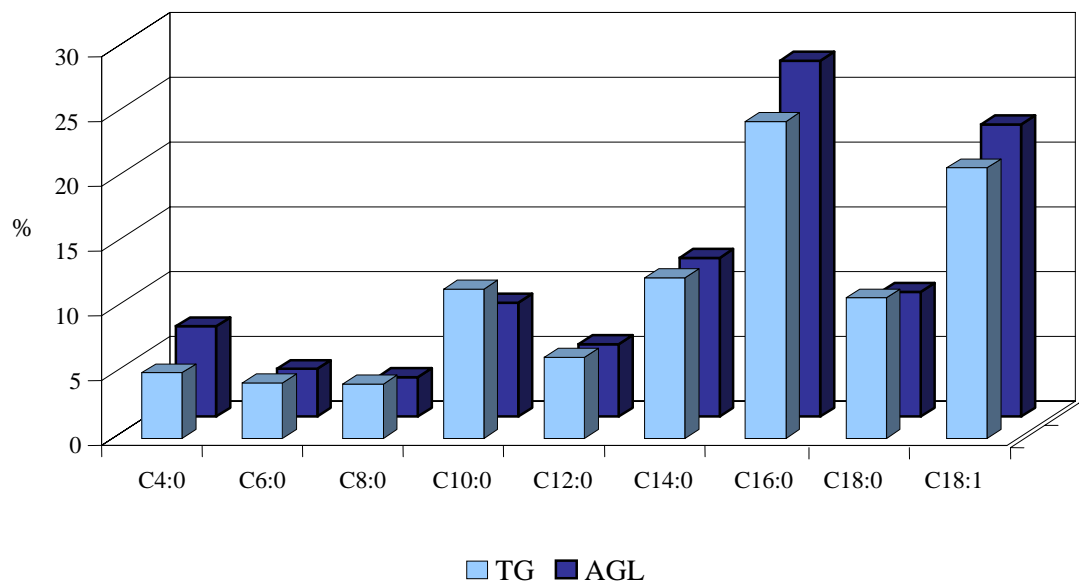


Figura 3.12: Comparación de los porcentajes de ácidos grasos en la fracción triglicéridica y la de los AGL para los quesos elaborados en **INVIERNO**. A) 15 días de maduración; B) 150 días de maduración

Con el transcurso de la maduración, los ácidos grasos de cadena corta aumentaron en la fracción de los AGL. El ácido butírico experimentó la variación más notable con la maduración, llegando a invertirse su proporción en ambas fracciones entre los 15 y los 150 días de maduración.

Todo esto podría ser debido, como se ha comentado anteriormente a que, por un lado, las lipasas hidrolizan preferentemente residuos de ácidos grasos esterificados en las posiciones 1 y 3 del triglicérido, y son los ácidos grasos de cadena corta los que se encuentran esterificados predominantemente en estas posiciones (De la Fuente *et al.*, 1993), por ello se van liberando al medio, y por otro lado, a que los ácidos grasos de cadena larga son más susceptibles de ser reincorporados a los triglicéridos mediante la síntesis de ésteres catalizada por lipasas (Sousa y Malcata, 1997). En el caso de las muestras de queso fabricadas en invierno se observó el mismo comportamiento (Figura 3.12).

Estos resultados son coincidentes con los encontrados por De la Fuente *et al.* (1993) para queso Manchego conservado en aceite de oliva, en el que los ácidos grasos de cadena corta fueron más abundantes en la fracción de los AGL que en la de los triglicéridos.

3.4. CONCLUSIONES

1. La lipólisis experimentada por las muestras de queso Manchego no fue muy intensa, tal y como era de esperar para esta variedad de queso.
2. El perfil de AGL en las muestras de queso Manchego analizadas fue típico de los quesos de oveja. Los AGL mayoritarios encontrados fueron, según la longitud de la cadena hidrocarbonada y de su grado de saturación, el butírico ($C_{4:0}$) saturado de cadena corta, con porcentajes del 1 al 7% del total, el mirístico ($C_{14:0}$), saturado de cadena media, con porcentajes entre el 9 y el 12% del total, el palmítico ($C_{16:0}$), saturado de cadena larga, entre el 26 y el 33% y el oleico ($C_{18:1}$), insaturado de cadena larga, entre el 23 y el 34% del total de AGL.
3. En general, se observó una tendencia al aumento de los AGL conforme avanzaba el tiempo de maduración. Este aumento fue mucho más acusado para los AGL de cadena corta ($C_{4:0}$, $C_{6:0}$ y $C_{8:0}$), los cuales llegaron, en algunos casos, a triplicar su concentración desde el inicio (15 días) hasta el final del período de maduración (150 días).
4. Los AGL de cadena corta mostraron una buena correlación con el tiempo de maduración (coeficientes de correlación R^2 superiores a 0,8), por lo que podrían ser utilizados a la hora de establecer índices de maduración según el contenido en AGL.
5. En general, el lote de quesos Manchegos elaborados en primavera presentó las mayores concentraciones de AGL totales durante el período de maduración estudiado, seguido por el lote de invierno. El lote de quesos con menor contenido en AGL totales fue el elaborado en otoño. La leche de partida con un mayor contenido en grasa total fue la del lote de otoño, con lo cual parece ser que este parámetro no afecta de forma significativa al grado de lipólisis experimentada por los quesos. El distinto grado de lipólisis podría ser debido a diferencias en la actividad lipásica, o a diferencias en la manipulación de la cuajada en cada caso, ya que los quesos fueron elaborados a escala semiindustrial.

6. Según los resultados del ANOVA, los quesos Manchegos elaborados en invierno tuvieron contenidos significativamente mayores de AGL de cadena corta que el resto ($p<0,05$), mientras que los de primavera, presentaron las mayores cantidades de AGL de cadena larga ($p<0,05$).
7. El Análisis de Componentes Principales de las muestras de queso de cada uno de los tres lotes por separado puso de manifiesto que, en general, a partir de los 45-60 días de maduración, los quesos experimentaron un aumento en su contenido en AGL de cadena corta. Esto sería importante a considerar si se tiene en cuenta que los quesos Manchegos de D. O. sólo pueden salir al mercado con un tiempo mínimo de maduración de 60 días, con lo cual, a partir de ese momento probablemente poseerían cantidades considerables de AGL de cadena corta que, como ya se ha comentado anteriormente, influyen de forma significativa en el aroma y en el sabor del queso.
8. El análisis de Componentes Principales de los datos de concentración de AGL de los tres lotes en conjunto corroboró los resultados del ANOVA y puso de manifiesto que existen diferencias entre los quesos de primavera, otoño e invierno, fundamentalmente en cuanto a su contenido en AGL de cadena corta y larga. El lote de primavera presentó las menores concentraciones en AGL de cadena corta y las más altas para los de cadena larga; el lote de otoño presentó concentraciones intermedias de estos ácidos, y el lote elaborado con leche de invierno tuvo las mayores concentraciones de AGL de cadena corta y los contenidos más bajos en AGL de cadena larga.
9. Los ácidos grasos mayoritarios encontrados en la fracción de los triglicéridos fueron los mismos que los de la fracción de AGL, si bien los ácidos grasos de cadena corta fueron, al principio de la maduración, algo más abundantes en la fracción de los triglicéridos, y con el transcurso de la maduración se fueron liberando hasta alcanzar proporciones iguales o incluso mayores en algunos casos, en la fracción de AGL que en la de los triglicéridos.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

- Albrecht, T. W. y Jaynes, H. O. (1955). Milk lipases. *Journal of Dairy Science* 38, 137-144.
- Anifantakis, E. M. (1986). Comparison of the physico-chemical properties of ewe's and cow's milk. *Federación Internacional de Lechería* 202, 42-53.
- Anon (1991). Determination of free fatty acids in milk and milk products. FIL-IDF Standard 265. *International Dairy Federation*, Brussels.
- Bills, D. D., Scanlan, R. A., Lindsay, R. C. y Sather, L. (1969). Free fatty acids and the flavour of dairy products. *Journal of Dairy Science* 52, 1340-1345.
- Brennaud, C., Ha, J. K. y Lindsay, R. C. (1989). *Journal of Sensory Studies*, 4, 105-120.
- Contarini, G. y Topino, P. M. (1995). Lipolysis in Gorgonzola cheese during ripening. *International Dairy Journal* 5, 141-155.
- De la Fuente, M. A. y Juárez, M. (1993). Revisión: Determinación de ácidos grasos libres en productos lácteos. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 33, 247-269.
- De la Fuente, M. A., Fontecha, J. y Juárez, M. (1993). Fatty acid composition of the triglyceride and free fatty acid fractions in different cow-, ewe- and goat-milk cheeses. *Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung Forschung* 196, 155-158.
- Deeth, H. C. y Fitzgerald, C. H. (1976). Lipolysis in dairy products: a review. *Australian Journal of Dairy Technology* June, 53-61.

- Driessen, F. M. (1989). Heat inactivation of lipases and proteinases (indigenous and bacterial), in: Heat-induced changes in milk, Bulletin 238, *International Dairy Federation*, Brussels.

- El Soda, M., El-Wahab, H. A., Ezzat, N., Desmazeaud, M. J. y Ismail, A. (1986). The esterolytic and lipolytic activities of the lactobacilli. II. Detection of esterase system of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Lait* 66, 431.

- Fernández-García, E., Ramos, M., Polo, C., Juárez, M. y Olano, A. (1988). Enzyme accelerated ripening of Spanish hard cheese. *Food Chemistry*, 28, 63-80.

- Forss, D. A. (1979). Review of the progress of dairy science: Mechanisms of formation of aroma compounds in milk and milk products. *Journal of Dairy Research*, 46, 691-706.

- Galvano, G. y Scena, V. (1984). Research on the milk of domestic ruminants. 1. Considerations and comparisons of fatty acids of the lipidic fraction of the milk of sheeps, goats, cows and buffaloes. *World Reviews of Animal Production* XX, 71-79.

- García-Ruiz, A. (1996). Estudio estadístico para predecir el tiempo de maduración del queso Manchego e identificación de la microbiota. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real.

- Gatusso, A. M. y Fazio, G. (1980). Characteristics and composition of milk fat from sheep of Sicilian breeds. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 57, 530-535.

- Gómez, R., Fernández-Salguero, J. y Marcos, A. (1987). Composición en ácidos grasos libres y combinados de algunas variedades de quesos comerciales. *Grasas y Aceites* 38, 23-26.

- González de Llano, D. y Ramos, M. (1989). Composición química de la leche de oveja. *Ovis* 2, 9-19.
- Juárez, M., De la Fuente, M. A. y Fontecha, J. (1992). Improved gas chromatographic method for the determination of the individual free fatty acids in cheese using a capillary column and PTV injector. *Chromatographia* 33, 351-356.
- Juárez, M., Alonso, L. y Ramos, M. (1983). Lipólisis y proteólisis del queso de Cabrales durante la maduración. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 23, 541-551.
- Juárez, M., Martínez-Castro, I. y Ramos, M. (1980). Composición en ácidos grasos de quesos Manchegos conservados en aceite. *Proceeding 3^{er} Congreso Nacional de Química*. Sevilla. Química y Tecnología de Alimentos, 179-185.
- Law, B. A. y Sharpe, M. E. (1977). The influence of the microflora of Cheddar cheese on flavour development. *Dairy Industries International* 42, 10-14.
- Lowenstein, M., Stephen, J. S., Harold, M. B. y Frank, J. F. (1980). Research on goat milk: a review. *Journal of Dairy Science* 63, 1631-1636.
- Luquet, F. M. (1991). Leche de oveja: Composición y propiedades. *Leche y productos lácteos: vaca, oveja y cabra, parte II*. Ed. Acribia (Zaragoza).
- Macedo, A. C. y Malcata, F. X. (1996). Changes in the major free fatty acids in Serra cheese throughout ripening. *International Dairy Journal* 6, 1087-1097.
- Metcalf, L. D. y Wang, C. N. (1981). Rapid preparation of fatty acid methyl esters using organic base-catalyzed transesterification. *Journal of Chromatography Science* 19, 530-535.

- Nájera, A. I., Barrón, L. J. R. y Barcina, Y. (1993). Review: Lipid fraction composition of cow's, sheep's and goat's cheese, and the influence on its quality. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 33, 345-363.
- Nájera, A. I., Barrón, L. J. R. y Barcina, Y. (1994). Changes in free fatty acids during the ripening of Idiazábal cheese: influence of brining time and smoking. *Journal of Dairy Research* 61, 281-288.
- Nakae, T. y Elliot, J. A. (1965a). Volatile fatty acids produced by some lactic acid bacteria. I. Factors influencing production of volatile fatty acids from casein hidrolisate. *Journal of Dairy Science* 48, 287-291.
- Nakae, T. y Elliot, J. A. (1965b). Volatile fatty acids produced by some lactic acid bacteria. II. Selective formation of fatty acids by degradation of amino acids. *Journal of Dairy Science* 48, 293-297.
- Núñez, M., Gaya., P., Medina, M., Rodríguez-Marín, M. A. y García-Aser, C. (1986a). Changes in microbiological, chemical, rheological and sensory characteristics during ripening of vacuum packaged Manchego cheese. *Journal of Food Science* 51, 1451-1455.
- Núñez, M., García-Aser, C., Rodríguez-Marín, M. A, Medina, M. y Gaya, P. (1986b). The effect of ripening and cooking temperatures on proteolysis and lipolysis in Manchego cheese. *Food Chemistry* 21, 115-123.
- Olivecrona, T. y Bengtsson-Olivecrona, G. (1991). Indigenous enzymes in milk: Lipase. *Food Enzymology*, vol.1, P. F. Fox (ed.), Elsevier Applied Science, London.
- Olmedo, G. R. y Coll-Hellín, L. (1976). Contribución al estudio de la grasa de leche de ovejas españolas. *Anales de Bromatología* 38, 211-340.

- Ordóñez, J. A. (1987). Aspectos microbiológicos y bioquímicos de la maduración del queso. *Industrias Lácteas Españolas* 106, 48-51.
- Otherholm, A., Ordal, Z. J. y Witter, L. D. (1976). Glycerol ester hydrolase activity of *Propionibacterium shermanii*. *Journal of Dairy Science* 53, 592.
- Rafecas, M., Boatella, J. y De la Torre, M. C. (1985). Determinación y evolución de los ácidos grasos libres y totales durante la maduración de un queso tipo Parmesano. *Anales de Bromatología* 37, 229-241.
- Ramos, M. y Martínez-Castro, I. (1976). Étude de la protéolyse du fromage type Manchego au cours de l'affinage. *Lait* 56, 164-176.
- Routaboul, M. (1981). Communic. Inter. Lab. Societé des Caves. Roquefort, 1981.
- Sorhaug, T. y Stepaniak, L. (1977). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology* 8, 35-41.
- Sousa, M. J. y Malcata, F. X. (1997). Ripening of ovine milk cheeses: effects of plant rennet, pasteurization and addition of stater on lipolysis. *Food Chemistry* 427-432.
- Sousa, M. J., Balçao, V. M. y Malcata, F. X. (1997). Evolution of free fatty acid profile during ripening in cheeses manufactured from bovine, ovine and caprine milks with extracts of *Cynara cardunculus* as coagulant. *Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung Forschung A* 205, 104-107.
- SPSS for Windows (1999). Version 9.0.1.
- Stadhouders, J. y Veringa, H. A. (1973). Fat hydrolysis by lactic acid bacteria in cheese. *Netherland Milk Dairy Journal* 27, 77-91.

- Virgili, R., Parolari, G., Bolzoni, L., Barbieri, G., Mangia, A., Careri, M., Spagnoli, S., Panari, G. y Zannoni, M. (1994). Sensory-chemical relationships in Parmigiano-Regiano cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 27, 491-495.
- Walstra, P. y Jennes, R. (1984). *Química y Física Lactológica*. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Woo, A. H., Kollodge, S. y Lindsay, R. C. (1984). Quantification of major free fatty acids in several cheese varieties. *Journal of Dairy Science* 67, 960-968.

CAPÍTULO 4

ESTUDIO DE LA UTILIZACIÓN DE DISTINTOS CULTIVOS INICIADORES EN EL QUESO MANCHEGO. USO DE *Lactobacillus plantarum* COMO CULTIVO ADJUNTO DEL starter.

4.1. INTRODUCCIÓN: ESTADO ACTUAL DEL TEMA

La leche constituye un sistema físico-químico muy complejo. Es una mezcla de sustancias en equilibrio definidas: lactosa, glicéridos de los ácidos grasos, caseínas, albúminas, sales, etc. Es uno de los alimentos de mayor valor biológico, y por lo tanto, de gran utilidad para la alimentación humana y animal. Pero por otro lado, debido a su riqueza en nutrientes, al pH que posee la leche fresca (en torno a 6,6) y a la temperatura de ordeño (37 °C), constituye un medio ideal para el desarrollo y multiplicación de los microorganismos.

Incluso aunque el animal esté sano, existen siempre bacterias banales que contaminan la leche en el momento del ordeño. Y si además el animal está enfermo, los microorganismos pueden alcanzar el interior de la ubre por vía endógena (debido a la presencia o a la actuación de microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella*, etc). Pero es fundamentalmente durante el ordeño cuando se dan las principales fuentes de contaminación de la misma: a través del equipo de ordeño y utillaje, del aire y por medio del personal.

La actividad de algunos microorganismos que contaminan la leche es beneficiosa para el hombre ya que participa activamente en los cambios físicos, químicos y organolépticos que experimenta la leche durante la preparación de los diversos productos lácteos. Por otro lado, la actividad microbiana incontrolada es perjudicial y da lugar a la alteración de la misma.

En diversos países los quesos pueden ser elaborados tanto con leche cruda como con leche pasteurizada. La pasteurización de la leche a 65 °C durante 30 minutos o a 72°C/15-17s, destruye los microorganismos patógenos, contaminantes y algunos otros microorganismos que pueden producir algún tipo de defecto en la fabricación del queso. Se suelen denominar quesos artesanales los elaborados con leche cruda e industriales los fabricados con leche pasteurizada.

Hoy en día todavía existen variedades de quesos que se elaboran artesanalmente; la microbiota de estos quesos puede llegar a ser muy compleja e incluir numerosas especies bacterianas. Sin embargo, la mayoría de los quesos elaborados actualmente se fabrican de forma industrial, es decir, con leche pasteurizada, ya que se controla mejor la acidez, se asegura una mayor uniformidad del producto y se mejoran las condiciones sanitarias en la fabricación. Sin embargo, muchos fabricantes de queso, consideran que los quesos elaborados con leche cruda dan lugar a productos con un aroma y un sabor más intenso.

Cuando la leche se somete a un tratamiento térmico la flora láctica es destruída, y como estas bacterias desempeñan un papel esencial en la elaboración de los quesos y de los distintos productos lácteos, es imprescindible añadir a la leche cultivos iniciadores o *starters*.

En la fabricación de la mayoría de las variedades de queso, se añaden a la leche, antes de la coagulación, cepas de diferentes especies de bacterias lácticas cuidadosamente seleccionadas. Estas cepas se denominan cultivos iniciadores o *starters*, y se definen como cultivos de una o varias cepas, pertenecientes a una o varias especies de bacterias deseables, que se utilizan para inocular la leche pasteurizada, fundamentalmente con el objeto de iniciar la fermentación. Su función principal es la producción de ácido láctico y, en algunos casos, la producción de compuestos responsables del sabor, como ácido acético, acetaldehído y diacetilo. La producción de ácido tiene, por tanto, tres funciones importantes: favorece la actividad del cuajo, ayuda al desuerado de la cuajada, reduciendo así el contenido en humedad del queso, y ayuda a prevenir el crecimiento de bacterias indeseables en el queso. Estos cultivos se denominan iniciadores o *starters* porque son los que inician la producción de ácido.

Teniendo en cuenta las funciones de un cultivo iniciador, la elección de las cepas que lo forman ha de llevarse a cabo siguiendo unos criterios de aptitud tecnológica y organoléptica, como son: su capacidad acidificante, la capacidad de producir compuestos responsables del aroma, capacidad de degradación de las proteínas (actividad proteolítica), temperatura óptima de crecimiento, comportamiento en asociación con otras especies microbianas, y en algunos casos, la actividad lipolítica.

El grupo de las bacterias lácticas “*sensu stricto*” está constituido por los siguientes géneros:

1. Bacterias en forma de coco: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc* y *Atopobium*.
2. Bacterias en forma de bacilo: *Lactobacillus* y *Carnobacterium*.
3. Otros géneros afines: *Bifidobacterium*, *Micrococcus*, *Brevibacterium* y *Propionibacterium*.

De estos géneros de bacterias lácticas los más utilizados en la industria láctea como cultivos iniciadores o *starters* pertenecen a los géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*. Todas las bacterias lácticas empleadas en quesería como cultivos iniciadores son Gram-positivas, catalasa-negativas, inmóviles y no formadoras de esporas.

Los **lactococos** son células en forma de coco dispuestas en cadenas de longitud variable. Poseen un metabolismo homofermentativo, produciendo exclusivamente ácido L-láctico a partir de la lactosa. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C. Las especies de lactococos más comúnmente encontradas en la leche son: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* y *Lc. raffinolactis*. Clasificaciones anteriores distinguían *Streptococcus diacetylactis*, capaz de fermentar el citrato y producir diacetilo, pero actualmente este microorganismo no se diferencia de *Lc. lactis* subsp. *lactis* (Mundt, 1986).

Los lactococos se añaden para formar parte de los cultivos iniciadores. Constituyen la flora predominante al principio de la maduración en la mayoría de los quesos (con recuentos superiores a 10^9 ufc/g) y aseguran la transformación de la lactosa residual en ácido láctico. Algunas especies producen además pequeñas cantidades de compuestos secundarios (acetaldehído, etanol, ácido acético, etc.) que contribuyen al aroma del queso. La biovariedad *diacetylactis* es el origen de la formación de diacetilo por degradación del citrato y también produce cantidades importantes de acetaldehído. Pero su presencia en una gran proporción en los cultivos *starters* puede ser responsable de defectos en el aroma.

Los lactococos están dotados de un sistema proteolítico complejo y, por ello, son los principales agentes proteolíticos en los quesos de pasta prensada tipo Cheddar, Gouda o Saint-Paulin. Debido a su riqueza en enzimas proteolíticos, los lactococos intervienen en la degradación de las caseínas, principalmente por sus proteasas de pared y por sus diferentes peptidasas intracelulares o unidas a las envolturas (Monnet *et al.*, 1993; Pritchard y Coolbear, 1993).

Así, los lactococos completan la acción del cuajo, liberando péptidos de pequeño tamaño y aminoácidos libres (Desmazeaud y Gripon, 1977), los cuales son el origen de compuestos que intervienen directamente en el sabor de los quesos o constituyen precursores de los aromas.

Por otro lado, las proteasas de pared de los lactococos pueden conducir a la aparición de defectos de amargor, debido a la liberación de péptidos cortos apolares. Esto es por lo que las investigaciones han ido dirigidas a la caracterización de diferentes cepas con actividades X-prolil-dipeptidil-aminopeptidasa, que pueden degradar ciertos péptidos amargos ricos en residuos prolil (Monnet *et al.*, 1993).

Los **leuconostoc** son células con forma esférica o lenticular dispuestas en pares y en cadenas y se encuentran comúnmente en cultivos mesófilos. Por tanto, pueden ser confundidos con los lactococos y con lactobacilos heterofermentativos. Se diferencian de los lactococos en dos aspectos fundamentales: (1) fermentan los azúcares de forma heterofermentativa, produciendo cantidades equimolares de lactato, etanol y CO₂; (2) producen el isómero D del lactato más que el L. Las especies de leuconostoc que más comúnmente se encuentran asociadas a la leche, y por tanto, al queso, son: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Ln. paramesenteroides* y *Ln. lactis*.

Los leuconostoc se presentan en los quesos en un número variable (entre 10³ y 10⁴ ufc/g) y son abundantes sobre todo en los quesos de leche cruda (Devoyod y Poullain, 1988).

Al ser bacterias heterofermentativas, producen etanol, ácido acético y diacetilo, contribuyendo de forma importante a la formación del aroma. Debido también a la producción de CO₂, participan en la “abertura precoz” del queso Roquefort (48 primeras horas), facilitando así la implantación regular del *Penicillium roqueforti* (Devoyod y Muller, 1969). También su presencia es deseable en el queso Manchego por la producción de los pequeños ojos característicos de su pasta, por lo que en algunos casos han sido incluidos en la composición del *starter* (Ramos *et al.*, 1981; Gómez *et al.*, 1999).

Las principales funciones de este género de bacterias son: cierta producción de ácido, contribución a la proteólisis y a la lipólisis, y producción de gas y de compuestos del aroma. En lo que concierne a la producción de ácido, a excepción de *Leuconostoc lactis*, que es capaz de acidificar la leche, las otras especies de *Leuconostoc* no acidifican la leche más que muy lentamente. Esta es la razón principal por la que los leuconostoc son siempre utilizados en cultivos iniciadores mixtos junto con bacterias lácticas acidificantes, principalmente con lactococos (Johansen y Kibenich, 1992).

Los leuconostoc son utilizados generalmente para producir compuestos aromáticos como diacetilo y acetoína. Así, a veces se incluyen en los cultivos iniciadores, especies de leuconostoc productores de aroma, como *Ln. mesenteroides*, *Ln. dextranicum* y/o *Ln. lactis*. Además la utilización de los leuconostoc, fundamentalmente la especie *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* en presencia de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* evita una producción excesiva de acetaldehído.

Los **lactobacilos** son células con forma de bacilo o bastón que pueden ser largos y delgados, o cortos, y normalmente aparecen dispuestos en forma de cadenas. Este género se divide en tres grupos: homofermentativos obligados o estrictos, heterofermentativos facultativos y heterofermentativos obligados. Los homofermentativos obligados fermentan las hexosas exclusivamente por la vía glicolítica, es decir, homofermentativamente a DL-, L- y/o D-lactato. Este grupo incluye todos los lactobacilos termófilos que forman parte de cultivos *starters*: *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*. Los lactobacilos heterofermentativos facultativos fermentan homofermentativamente las hexosas a lactato, y de forma heterofermentativa, las pentosas

y el gluconato a lactato y acetato. En este grupo se encuentran algunas de las especies presentes en cultivos iniciadores artesanales y en quesos maduros: *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* y *Lb. curvatus*. Generalmente se les conoce con el nombre de “*bacterias lácticas no starter*” (non starter lactic acid bacteria, NSLAB) o lactobacilos mesófilos. El grupo de los heterofermentativos obligados fermentan los azúcares de forma heterofermentativa produciendo concentraciones equimolares de lactato, etanol y CO₂. También pueden producir pequeñas cantidades de acetato. Generalmente, las especies de este grupo producen NH₃ a partir de la arginina. Las especies de lactobacilos pertenecientes a este grupo son *Lb. brevis* y *Lb. fermentum*, que también se consideran como NSLAB.

Los lactobacilos son especialmente abundantes en los quesos de pasta cocida, donde se utilizan formando parte del *starter* como especies termófilas heterofermentativas. La primera función que realizan es la acidificación, que favorece la sinéresis. De esta forma, se obtiene un extracto seco suficientemente elevado y un valor de pH suficientemente bajo como para que el queso pueda experimentar un período largo de maduración (Accolas *et al.*, 1980). El ácido láctico producido es utilizado a continuación por las bacterias propiónicas.

La segunda función que realizan los lactobacilos es contribuir a las características sensoriales del producto obtenido. Las células bacterianas van a liberar proteasas y peptidasas que participarán en la maduración, junto con la plasmina, en el caso de los quesos de pasta cocida. En efecto, los lactobacilos termófilos poseen un sistema proteolítico importante (El Soda y Desmazeaud, 1982) análogo al de los lactococos, con actividades peptidásicas elevadas que se traducen, al final de la maduración, en proporciones considerables de péptidos pequeños y aminoácidos libres.

En todos los quesos, los lactobacilos mesófilos homofermentativos *Lb. plantarum* y *Lb. casei* están presentes en un número considerable y se desarrollan activamente en el transcurso de la maduración. Debido a que poseen actividad proteolítica y peptidásica (El Soda *et al.*, 1978; El Soda *et al.*, 1983) y lipolítica (El Soda *et al.*, 1986), estos microorganismos intervienen en el afinado de los quesos y participan en la formación del

aroma, si bien aún no se conoce su papel de forma precisa (Khalid y Marth, 1990; Peterson y Marshall, 1990).

4.1.1. Cultivos iniciadores o *starters*

Los cultivos que se emplean como *starters* se dividen en cultivos mesófilos (con una temperatura óptima de crecimiento en torno a 30 °C), y termófilos (con una temperatura óptima alrededor de 42 °C). Cada uno de estos grupos se puede subdividir a su vez en *cultivos de cepas definidas* y *cultivos mixtos*.

Los *cultivos de cepas definidas* son cultivos puros, cuyas características fisiológicas son conocidas y están identificadas. Estas cepas son aisladas fundamentalmente de cultivos mixtos, pero también de productos fermentados por las bacterias lácticas de la flora nativa y de plantas. Antes de ser utilizadas comercialmente, se estudian sus propiedades tecnológicas más importantes, como la tolerancia a la sal, y la habilidad para crecer y producir ácido láctico en la leche, resistir el ataque de bacteriófagos, utilizar el citrato y producir queso de buena calidad.

Los *cultivos mixtos* contienen un número desconocido de cepas de la misma especie. También suelen contener bacterias de diferentes géneros dentro de las bacterias lácticas, como especies de *Lactococcus* y *Leuconostoc* en el caso de los cultivos mixtos mesófilos, y especies de *Streptococcus* y de *Lactobacillus* en el caso de cultivos mixtos termófilos. Los cultivos mixtos suelen utilizarse por fabricantes a pequeña escala, mientras que los cultivos definidos se utilizan en grandes plantas queseras.

La especie de *Lactococcus* utilizadas como *starters* más comúnmente encontradas en cultivos mixtos son *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lc. lactis* subsp. *lactis* y su función ya se ha comentado anteriormente. También muchos cultivos que se utilizan como *starters* contienen en su formulación cepas de especies de *Leuconostoc*, ya que muchas de ellas son capaces de metabolizar el citrato y producir CO₂ y compuestos aromáticos.

En los quesos elaborados con leche cruda, la producción de ácido láctico es a menudo impredecible, y como la microbiota de la leche es muy heterogénea, a menudo se produce el desarrollo de microbiota indeseable, lo cual da lugar a la producción incontrolada de gas y a la aparición de sabores anormales e indeseables en el queso. Por estas razones, la adición de un cultivo *starter* a la leche pasteurizada se ha convertido en una práctica universal. Sin embargo, se sabe que la pasteurización afecta de forma negativa a la calidad e intensidad del sabor y del aroma de algunos quesos, como el Manchego (Gaya *et al.*, 1990), ya que elimina en parte algunos de los sabores típicos del queso. Los cambios producidos en la leche debidos a la pasteurización incluyen la inactivación de enzimas, una ligera desnaturalización de las proteínas del suero y la destrucción de la microbiota termolábil. Según McSweeney *et al.* (1993), en un estudio realizado en queso Cheddar, la alteración de la microbiota de la leche, principalmente de las NSLAB, causada por la pasteurización, es probablemente el factor que afecta de una manera más significativa al proceso de maduración. Según Gaya *et al.* (1990), para que un queso Manchego fabricado con leche pasteurizada adquiriera la misma intensidad del sabor y del aroma que un queso Manchego elaborado con leche cruda y madurado durante 60 días, necesitaría ser madurado durante 92 días, a la misma temperatura.

Por otro lado, el hecho de que el queso elaborado con leche cruda desarrolla un sabor más intenso que el de leche pasteurizada (Gaya *et al.*, 1990; Lau *et al.*, 1991) ha provocado un creciente interés en la adición de NSLAB como adjuntos del cultivo *starter* a la leche pasteurizada en la elaboración de queso (Peterson y Marshall, 1990; McSweeney *et al.*, 1993; Lane y Fox, 1996; Lynch *et al.*, 1996; Gómez *et al.*, 1996a, Lynch *et al.*, 1997). Estas bacterias son fundamentalmente cepas seleccionadas de especies de lactobacilos mesófilos. La razón de su adición como cultivos adjuntos del *starter* radica en que estas bacterias se han encontrado en elevados recuentos en el queso maduro (en torno a 10^8 ufc/g), y se piensa, por tanto, que deben de tener alguna función. Sin embargo y aunque se ha investigado extensamente sobre este tema en las últimas décadas, el papel de estas bacterias en el desarrollo del sabor del queso no está del todo establecido. Estudios realizados en quesos Cheddar (McSweeney *et al.*, 1993) y Comté (Bouton y Grappin, 1995) elaborados con leche cruda y pasteurizada han demostrado que la microbiota nativa de la leche (fundamentalmente NSLAB) es la principal responsable de

las diferencias en las características entre los quesos de leche cruda y pasteurizada. Estos autores comprobaron que los elevados recuentos de NSLAB encontrados en queso de leche cruda durante la maduración causaban un aumento en la intensidad del sabor y del aroma y una ligera aceleración de la proteólisis (especialmente a nivel de la formación de aminoácidos libres). Recientemente se está incluyendo el uso de NSLAB en el cultivo iniciador para la fabricación del queso, sobre todo en el queso Cheddar. La adición de cepas definidas de lactobacilos mesófilos como adjuntos de las cepas de *Lactococcus* utilizados como *starter* a la leche pasteurizada, como una alternativa al uso de leche cruda, contribuye a la maduración del queso (Lane y Fox, 1996; Peterson y Marshall, 1990), acelera la formación de aminoácidos libres (Lynch *et al.*, 1996; Fox *et al.*, 1998) intensifica el sabor y el aroma (Muir *et al.*, 1996) y reduce la acumulación de péptidos amargos en el queso (Bartels *et al.*, 1987; Lemieux *et al.*, 1989; Gómez *et al.*, 1996b).

Debido a las condiciones que se dan durante la maduración, el interior del queso es un medio hostil para el desarrollo de bacterias. Presenta un pH relativamente bajo (en torno a 5), posee un contenido en sal relativamente alto (2-4%), carece de hidratos de carbono fermentables, es un medio anaeróbico y puede contener bacteriocinas producidas por las bacterias del *starter*. Por todo esto, el queso es un medio altamente selectivo y la microbiota no *starter* está dominada principalmente por algunas especies de lactobacilos mesófilos (*Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* y *Lb. curvatus*).

Las NSLAB crecen y se desarrollan desde recuentos iniciales muy bajos (<50 ufc/g) hasta aproximadamente 10^7 - 10^8 ufc/g en tres meses y constituyen la microbiota predominante en quesos madurados durante largos períodos de tiempo.

Muchas cepas pertenecientes a *Lb. paracasei* y a *Lb. plantarum* poseen un complejo peptidolítico y pueden, por lo tanto, contribuir a la proteólisis del queso durante la maduración (Beresford *et al.*, 1998).

En la elaboración del queso Manchego, la leche es generalmente inoculada con cultivos comerciales mixtos, los cuales están formados por cepas de *Lactococcus lactis*

subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* fermentadores del citrato y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (Gómez *et al.*, 1999).

En diversos trabajos se ha encontrado la presencia de especies de *leuconostoc* y de *lactobacilos* mesófilos durante la maduración del queso Manchego (Núñez, 1976; Núñez *et al.*, 1989; Cogan *et al.*, 1997). Ramos *et al.* (1981) propusieron un cultivo iniciador para la elaboración de queso Manchego que contenía especies de *leuconostoc* y de *lactobacilos*. Además, recientemente se ha estudiado la adición de bacterias lácticas (*lactococos* fundamentalmente) aisladas de quesos Manchegos de alta calidad elaborados con leche cruda, a la leche pasteurizada para la fabricación de esta variedad de queso (Gómez *et al.*, 1999). Sin embargo, no se ha realizado ningún estudio sobre la utilización de los *lactobacilos* como adjuntos del starter en la elaboración de queso Manchego.

En un estudio previo realizado en este Departamento sobre la identificación de la microbiota del queso Manchego, *Lb. plantarum* fue la especie predominante de los 148 aislados (28,89%), seguida de *Lb. casei* subsp. *casei* (14,43%), *Lc. lactis* subsp. *lactis* (13,40%), *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (10,31%) y *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (10,31%), (García *et al.*, 1995). Además se estudiaron las propiedades tecnológicas (actividad acidificante y proteolítica) de los distintos aislados (García *et al.*, 1997) y en base a estas propiedades se seleccionaron tres cepas pertenecientes a cada uno de los tres géneros de bacterias lácticas *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* de entre todas las ensayadas.

En el presente estudio se utilizaron estas cepas para fabricar dos lotes de quesos Manchegos, elaborados cada uno con una combinación diferente de las cepas seleccionadas. Además se fabricó un tercer lote de quesos Manchegos empleando un cultivo iniciador mixto comercial.

Los **objetivos** perseguidos en este estudio fueron:

- 1) Estudiar las posibles diferencias existentes entre los distintos lotes de quesos, elaborados con diferentes cultivos iniciadores, fundamentalmente a nivel de la proteólisis primaria y secundaria, estudiando el perfil de péptidos y aminoácidos libres, utilizando como herramienta estadística el Análisis Multivariante.
- 2) Investigar los cambios experimentados a lo largo de la maduración en cada uno de los tres lotes de quesos elaborados con los distintos cultivos iniciadores o starters.
- 3) Conocer el posible efecto de la utilización de *Lactobacillus plantarum* como adjunto del starter en la elaboración del queso Manchego y en las características sensoriales del mismo.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Preparación de los cultivos

Los microorganismos utilizados en el presente trabajo fueron aislados de quesos Manchegos artesanales de buena calidad (García *et al.*, 1995) y seleccionados por sus propiedades tecnológicas (García *et al.*, 1997). Las cepas seleccionadas y utilizadas en la elaboración de los quesos objeto de este estudio fueron las siguientes: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* y *Lactobacillus plantarum*, las cuales estaban conservadas en congelación a -20 °C en criotubos en caldo MRS con glicerina como agente crioprotector, formando parte de la colección de bacterias lácticas del grupo de Productos Lácteos, en el Departamento de Tecnología de Alimentos. Para su utilización como cultivo iniciador se liofilizaron, para lo cual las tres cepas se desarrollaron en medio caldo MRS durante una noche, a 30 °C los lactococos y leuconostocs, y a 37 °C los lactobacilos. Las células se recogieron por centrifugación (8000 g, 15 min) y se lavaron con agua destilada dos veces para eliminar por completo el medio de cultivo. A continuación las células se resuspendieron en 5 mL de leche lactosada (leche descremada en polvo reconstituída al 10% y adicionada de lactosa al 4%). La suspensión celular se repartió en viales de liofilización.

Los cultivos iniciadores se prepararon a partir de las cepas liofilizadas, combinando dichas cepas en las proporciones necesarias para dar lugar a los cultivos iniciadores correspondientes a cada lote, tal y como se describe a continuación:

Lote 1: *Lc. lactis* subsp. *lactis* (80%) + *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (20%).

Lote 2: *Lc. lactis* subsp. *lactis* (80%) + *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (10%) + *Lb. plantarum* (10%).

Para la elaboración de los quesos del lote 3 se utilizó un cultivo *starter* comercial mixto concentrado liofilizado (Ezal, Dangé-Saint-Romain, France), compuesto por cepas de *Lactococcus lactis* y de *Streptococcus thermophilus*.

Las cepas liofilizadas correspondientes a los lotes de queso 1 y 2 se inocularon conjuntamente en leche descremada estéril a una concentración final del 1% (aproximadamente 10^7 ufc/mL). Los cultivos se incubaron a 22 °C hasta que se alcanzó una acidez correspondiente a un pH entre 4,6-4,7 (aproximadamente 22 h). El cultivo así obtenido se conservó a 4 °C durante una noche hasta el momento de su utilización.

4.2.2. Elaboración de los quesos

Se elaboraron tres lotes de quesos, a escala semiindustrial, siguiendo la tecnología del Manchego en una quesera situada en la provincia de Ciudad Real. Para ello se utilizaron tres cubas con 200 L de leche pura de oveja pasteurizada (65 °C/30 min). Posteriormente a la pasteurización, la leche se dejó enfriar hasta unos 28-30°C y se procedió a la inoculación al 1% con los cultivos iniciadores anteriormente descritos para cada uno de los lotes.

Después de dejar transcurrir aproximadamente 30 minutos para que se desarrollasen las bacterias lácticas, se añadieron a cada cuba 7,5 g de cuajo (Marschall, fuerza 1/150.000), produciéndose la coagulación en 45 min. A continuación se procedió al corte de la cuajada hasta un tamaño de grano aproximadamente de 5 mm. Seguidamente, se recalentó la cuajada hasta una temperatura de 38 °C durante 10-15 min., para favorecer la sinéresis y tras desuerar se llenaron los moldes de plástico con la “flor” y la “pleita” impresas, características del Manchego. Los quesos (de aproximadamente 1Kg de peso cada uno) se prensaron durante 5-6 h a unos 15 °C y se salaron por inmersión en salmuera al 20% en NaCl a la misma temperatura durante aproximadamente 22 h. Al cabo de este tiempo, los quesos se transportaron hasta el laboratorio en condiciones de refrigeración y se introdujeron en una cámara de maduración a una temperatura de 12 °C y con una humedad relativa del 85%, donde fueron madurados durante 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 días. Cada lote elaborado estuvo constituido por 21 quesos, destinándose tres quesos iguales para cada una de las fechas de maduración a estudiar, con lo que el número total de quesos analizados fue de 63. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

4.2.3. Preparación de las muestras para el análisis

Para realizar los análisis se tomaron muestras de la leche pasteurizada, antes y después de la adición del cultivo iniciador, de las cuajadas elaboradas y de los quesos a los 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 días de maduración, para los tres lotes de quesos elaborados.

En el caso de los quesos, para cada una de las fechas de maduración consideradas y para cada lote, se tomaron de los tres quesos individuales las siguientes muestras:

- una porción de unos 50 g para el análisis microbiológico;
- una cuña de unos 250 g de peso, que tras ser desprovista de la corteza (1,5 cm de grosor) se trituró con una picadora eléctrica y se homogeneizó. Una vez realizados los análisis físico-químicos inmediatos (pH, Aw y extracto seco) se congeló en tarros de cristal de cierre hermético hasta realizar los posteriores análisis;
- una porción correspondiente aproximadamente a medio queso para el análisis sensorial;
- el resto se utilizó para el análisis de péptidos y aminoácidos.

4.2.4. Análisis microbiológico

Se efectuaron recuentos de microorganismos totales, de lactococos, de leuconostoc y de lactobacilos en la leche pasteurizada empleada en la fabricación, antes y después de la inoculación en cada una de las tres cubas, en la cuajada de cada uno de los lotes de quesos fabricados y en los quesos en todas las fechas de maduración consideradas en este estudio.

4.2.4.1. Preparación de las muestras para el análisis microbiológico

En el caso de la leche se tomaron 10 mL de cada una de las cubas y se homogeneizaron con 90 mL de citrato sódico al 2% (p/v) estéril, previamente calentado a 45 °C, durante 2 min a intervalos de 30 s en un triturador de palas.

En el caso de la cuajada se tomó una porción de 10 g y en los quesos una porción de 3,3 g aproximadamente de cada uno de los tres quesos independientes (para hacer un total de 10 g) correspondientes a cada una de las fechas de maduración y se homogeneizaron de la misma forma con 90 mL de citrato sódico al 2% (p/v) estéril previamente calentado a 45 °C.

A partir de los homogeneizados se realizaron las diferentes diluciones decimales en citrato sódico estéril al 2%.

4.2.4.2. Recuento de bacterias viables totales

El recuento de bacterias viables totales se realizó en medio PCA (Plate Count Agar) según las recomendaciones de la APHA (1976). A partir de la dilución correspondiente, se efectuó la siembra en profundidad (por duplicado) en placas de Petri estériles. Una vez solidificado el medio, las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h.

4.2.4.3. Recuento de lactococos

Se realizó según Terzaghi y Sandine (1975) en medio agar (Merck, Darmstad, Alemania) LM 17. Se realizó la siembra en superficie de 0,1 mL de la dilución correspondiente y las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h. Se contaron las colonias de color blanco con forma lenticular y tamaño igual o mayor a 0,5 mm de diámetro.

4.2.4.4. Recuento de leuconostoc

Se realizó por siembra en superficie en agar leuconostoc (ADSA), incubando las placas a 30 °C durante 48 h. Se contaron las colonias de aspecto mucoide.

4.2.4.5. Recuento de lactobacilos

Los recuentos de lactobacilos se realizaron en agar Rogosa (Merck, Darmstad, Alemania). Se efectuó la siembra en superficie de 0,1 mL de las diluciones

correspondientes y se incubaron las placas a 37 °C durante 48-72 h en anaerobiosis (Gas-Pack System, BBL). Se contaron las colonias blancas con forma lenticular con un diámetro igual o mayor a 0,5 mm.

Todos los recuentos se efectuaron en las placas que contenían entre 30 y 300 colonias.

4.2.5. Análisis físico-químicos

Las determinaciones de la actividad del agua (A_w), del pH, del extracto seco (ES), de cloruros, de nitrógeno total (NT) y de nitrógeno proteico (NP) se realizaron según se ha indicado previamente en el Capítulo 2 de esta Memoria.

4.2.6. Estudio de la proteolisis

4.2.6.1. Fracción de nitrógeno soluble en agua

La obtención de la fracción de nitrógeno soluble en agua (NS) está descrita en el Capítulo 2 de esta Memoria.

4.2.6.2. Fracción de nitrógeno soluble en agua a pH 4,6

Se extrajeron las fracciones insoluble y soluble en agua a pH 4,6 de las muestras de queso de los distintos lotes elaborados y en todas las fechas de maduración. Para ello, una muestra de 50 g queso se mezcló con 100 g de agua y se homogeneizó durante 5 min en un agitador de palas. Se ajustó el pH del homogeneizado hasta 4,6 con HCl 1M, se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente y se volvió a ajustar el pH. El homogeneizado resultante se mantuvo a 40 °C en baño de agua durante 1h y se centrifugó a 3000 g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante (fracción soluble a pH 4,6) se filtró a través de lana de vidrio y se congeló para realizar su posterior fraccionamiento. El precipitado (fracción insoluble en agua a pH 4,6) se liofilizó para realizar posteriormente la electroforesis en gel de urea-poliacrilamida (Ver apartado 4.2.6.5.).

4.2.6.3. Fracción de nitrógeno soluble en etanol al 70%

A 30 mL de la fracción soluble en agua a pH 4,6 se añadieron 70 mL de etanol absoluto. La mezcla se mantuvo durante 30 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 g durante 30 min a 20 °C. El sobrenadante (fracción soluble en etanol, que contiene los péptidos de menor tamaño y también aminoácidos libres) se filtró a través de papel de filtro Whatman n° 1 y se le extrajo el etanol en un rotavapor a 30 °C a vacío. El precipitado (fracción insoluble en etanol, que contiene péptidos de mayor tamaño) se redisolvió en la mínima cantidad de agua y se liofilizó hasta su posterior análisis por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).

4.2.6.4. Fracción soluble en ácido fosfotúngstico al 5%

La fracción soluble en ácido fosfotúngstico (N-PTA) se preparó como se ha descrito anteriormente (Capítulo 2 de esta memoria).

4.2.6.5. Electroforesis en gel de urea-poliacrilamida

Se realizó la electroforesis en gel de urea-poliacrilamida (pH 8,9) de la fracción insoluble a pH 4,6 del queso. Para ello se siguió el método de Andrews (1983) con las modificaciones descritas por Shalabi y Fox (1987). Se utilizó una cubeta vertical modelo Protean II XI (Biorad). Las concentraciones de acrilamida y bisacrilamida fueron T= 4% y C= 12,5%, siendo $T = (g \text{ acrilamida} + g \text{ bisacrilamida})/100$; $C = g \text{ bisacrilamida} \times 100\%/T$. La tinción de los geles se realizó con azul de Coomassie brillante G 250, según el método de Blakesley y Boezi (1977).

-Preparación de las muestras de caseína

Se disolvieron 10 g de las muestras de la fracción insoluble en agua a pH 4,6 en 1 mL de tampón de la muestra (ver disoluciones stock), calentando a 50 °C durante unos minutos.

-Disoluciones stock

1. Disolución de acrilamida

Acrilamida 40% p/v en agua

2. Tampón del gel de concentración

4,15 g tris-(hidroximetil)-metilamina

192,85 g urea

2,86 mL HCl

-Disolver y diluir hasta 500 mL con agua y ajustar el pH a 7,6 con HCl

3. Tampón del gel de separación

32,15 g tris-(hidroximetil)-metilamina

192,85 g urea

2,86 mL HCl

-Disolver y diluir hasta 500 mL con agua y ajustar el pH a 8,9 con HCl

4. Tampón de los electrodos

15 g tris-(hidroximetil)-metilamina

73 g glicina

-Disolver y diluir hasta 5 L con agua y ajustar el pH a 8,4 con HCl

5. Tampón de la muestra

1,5 g tris-(hidroximetil)-metilamina

98 g urea

0,8 mL HCl

1,4 mL 2-mercaptoetanol

0,3 g azul de bromofenol

-Disolver y diluir hasta 200 mL con agua

6. Persulfato amónico 10% p/v en agua

7. Solución de tñido

Una disolución acuosa de Azul de Coomassie Brillante G 250 se aade a un volumen igual de H₂SO₄ y se deja una noche. A continuaci3n la disoluci3n se filtra a trav3s de papel de filtro Whatman n3 1 y el filtrado se mezcla con KOH 10 M en la proporci3n 9:1. Se aade 3cido tricloroac3tico hasta conseguir una disoluci3n final al 12% p/v en tricloroac3tico.

-Disoluciones para la preparaci3n del gel

Estas disoluciones no se preparan hasta el d3a de la realizaci3n de la electroforesis.

1. Disoluci3n del gel de concentraci3n

5 mL de disoluci3n de acrilamida

45 mL de tamp3n del gel de concentraci3n

0,1 g N, N, N', N'-metilenbisacrilamida

-Todo esto se mezcla y se filtra a trav3s de papel de filtro Whatman n3 113.

Al filtrado se aaden 50 μL de N,N N',N'-tetrametil3ndiamina (TEMED).

2. Disoluci3n del gel de separaci3n

22,5 mL de disoluci3n de acrilamida

52,5 mL de tamp3n de gel de separaci3n

0,375 g N, N, N', N'-metilenbisacrilamida

-Se mezcla todo y se filtra a trav3s de papel de filtro Whatman n3 113. Al filtrado se aaden 50 μL de TEMED.

-Preparaci3n del gel

Una vez montado el equipo de electroforesis e inmediatamente antes de su uso, se aadieron 282 μL de persulfato am3nico al 10% a la disoluci3n del gel de separaci3n, para iniciar la polimerizaci3n. Esta disoluci3n se deposit3 entre dos placas de vidrio de 20 x 20 cm, fijadas a la cubeta de electroforesis, y a continuaci3n se verti3 una fina capa de agua,

dejando polimerizar completamente el gel (40-60 min). Transcurrido este tiempo se retiró cuidadosamente la capa de agua con papel de filtro y se añadieron 300 μL de persulfato amónico a la disolución del gel de concentración. Se mezcló y se depositó sobre el gel de separación, introduciendo finalmente un peine formador de pocillos que permite la aplicación de 15 muestras. Se dejó polimerizar el gel de concentración (aproximadamente 60 min) y posteriormente se retiró el peine. El gel se colocó en el equipo de electroforesis, llenando éste con tampón de los electrodos.

-Electroforesis

Primero se aplicó a los geles un voltaje de 280 V durante 30-40 min. A continuación se aplicaron las muestras (caseinato sódico: 8 μL , caseína ovina: 5 μL y las muestras de caseína: 11 μL). Se utilizó agua fría en recirculación para la refrigeración del sistema. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 280 V a través del gel de concentración y a 300 V a través del gel de separación.

-Teñido y decoloración del gel

Los geles se tiñeron por inmersión en la disolución de teñido durante toda la noche. La decoloración se efectuó cambiando los geles varias veces a un recipiente con agua destilada hasta que el fondo apareció de color claro.

4.2.6.6. Análisis de los péptidos de las fracciones insoluble y soluble en etanol al 70% por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

Se estudió el perfil peptídico de las fracciones insoluble y soluble en etanol al 70%. Para ello se utilizó un equipo Varian (Varian Associates Inc., Walnut Creek, Ca, USA) formado por un colector de muestras (modelo 410), un sistema de distribución de disolventes con tres bombas (modelo 230), un espectrofotómetro programable ProStar de longitud de onda múltiple (modelo 310), conectados a un ordenador en el que estaba instalado un programa para el control del sistema y adquisición de datos Varian Star Workstation. Se utilizó una columna analítica Nucleosil RP-8 (250 x 4mm, 5 μm de

tamaño de partícula, 300 Å de tamaño de poro) y una precolumna (4,6 x 10 mm) (Capital HPLC Ltd., Broxburn, West Lothian, UK). La elución se monitorizó a 214 nm utilizando una fase móvil de dos disolventes: A) ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) (TFA, calidad secuenciación; Sigma, St. Louis, USA) en agua desionizada calidad HPLC (milli-Q system, Waters Corp.) y B) TFA al 0,1% en acetonitrilo (calidad HPLC, Rathburn Chemicals Ltd., Walkerburn, Escocia). Las muestras liofilizadas de las fracciones insoluble y soluble en etanol se disolvieron en el disolvente A (10 mg/mL), se filtraron a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 µm (Sartorius GmbH, Gottingen, Alemania) y se inyectó una alícuota del filtrado utilizando un flujo de elución de 0,75 mL/min. El gradiente utilizado empezó con 100% de A durante 5 min, continuó con un gradiente lineal hasta 50% de A (50% de B) durante 55 min, se mantuvo 50% de A (50% de B) durante 6 min, a continuación un gradiente lineal hasta 40% de A (60% de B) durante 4 min y se mantuvo 40% de A (60% de B) durante 3 min. La columna se lavó con 95% de B (5% de A) durante 5 min y a continuación se equilibró con 100% de A durante 5 min para proceder a las condiciones iniciales de elución antes de la siguiente inyección. El tiempo total de adquisición de datos en el cromatograma fue de 70 min.

4.2.6.7. Análisis de aminoácidos libres

Las concentraciones de aminoácidos libres se determinaron a partir de la fracción de nitrógeno soluble en agua a pH 4,6. Para ello se tomaron 10 mL de esta fracción y se precipitaron los péptidos de alto peso molecular con el mismo volumen de ácido tricloroacético al 24%, para conseguir así una concentración en ácido tricloroacético del 12%. Se agitó en vortex durante algunos minutos y se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación se centrifugó a 13000 g durante 30 minutos y el sobrenadante se diluyó con tampón citrato sódico 0,2 M, pH 2,2 para dar aproximadamente 250 nmol de cada residuo de aminoácido. Las muestras se diluyeron (1:2) con patrón interno (norleucina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. USA) para dar 125 nmol de cada residuo de aminoácido por volumen de inyección, y se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm (Gelman, Ltd., Dun Laoire, Dublin, Ireland). Se inyectaron 50 µL del filtrado en el analizador. Los aminoácidos se separaron mediante cromatografía de intercambio iónico con derivatización post-columna con ninhidrina y detección colorimétrica en el visible,

utilizando un analizador de aminoácidos Beckman modelo 6300 (Beckman Instruments Ltd., High Wycombe, UK), equipado con una columna de intercambio catiónico de iones Na^+ Beckman modelo P-N 338052 (12 cm x 0,4 cm). Los aminoácidos se detectaron a 570 nm a excepción de la prolina, que se detectó a 400 nm. Los resultados se recogieron en un sistema de adquisición de datos Minichrom (VG Data systems, Altrincham, Cheshire, UK).

4.2.7. Análisis sensorial

Las muestras de quesos fueron evaluadas sensorialmente a partir de los 60 días de maduración, debido a que este tiempo es el mínimo exigido por el Consejo Regulador de D. O. Manchego para su comercialización. Así, se evaluaron las muestras de 60, 90, 120 y 150 días de maduración. Para ello se utilizó un panel de cata formado por 10 jueces, los cuales poseían experiencia en la evaluación de diversos tipos de quesos (González-Viñas *et al.*, 2001a) y del queso Manchego (González-Viñas *et al.*, 2001b).

4.2.7.1. Análisis Sensorial Descriptivo (ISO 6564, 1985 y ISO 11036, 1994)

Se realizaron varias sesiones, catándose las muestras de cada fecha de maduración por duplicado en días consecutivos. A cada juez se le presentaron 3 muestras en cada sesión, a temperatura ambiente, dispuestas al azar. Para todos los atributos las muestras se cortaron en forma de cubo de unos $1,5 \text{ cm}^3$ y se dispusieron en platos pequeños, excepto para la evaluación del aspecto al corte, que se realizó en medio queso. Para la identificación de las muestras se utilizaron claves de tres dígitos, con dos números y una letra central al azar.

Los atributos a juzgar fueron seleccionados previamente por consenso entre los jueces, los cuales utilizaron algunas referencias para evaluar cada uno de los atributos de acuerdo con las recomendaciones del COST 95 (1999). Para evaluar su intensidad se utilizaron escalas no estructuradas de 10 cm. Finalmente todos los jueces emitieron su impresión global sobre las muestras evaluadas, utilizando una escala hedónica no estructurada de 10 cm (0= impresión mala hasta 10= excelente).

En la Figura 4.1 se presenta el formulario presentado a los catadores para la evaluación del queso Manchego.

Las pruebas se realizaron en una sala de cata que reunía todas las condiciones especificadas en la Norma ISO 8589 (1988).

4.2.8. Análisis estadístico

Se aplicó el Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor, utilizando el test de Student-Newman-Keuls (S-N-K) a los valores de composición físico-química y fracciones nitrogenadas de los tres lotes de quesos elaborados, en las distintas fechas de maduración estudiadas.

Los perfiles peptídicos de las fracciones de nitrógeno insoluble y soluble en etanol al 70% se analizaron mediante análisis estadístico multivariante, utilizando el Análisis de Componentes Principales (ACP) y en algunos casos el Análisis de Conglomerados o Clusters. Los datos para estos análisis se obtuvieron reconociendo visualmente picos similares en los cromatogramas y usando la altura de pico como variable, como en Pripp *et al.* (1999).

A los datos obtenidos para los aminoácidos libres se aplicó el ACP, el Análisis de Conglomerados y también el Análisis de correlación con el tiempo.

El ACP se aplicó utilizando la matriz de correlación y con rotación Varimax y el Análisis de Conglomerados se aplicó usando como regla de similitud de muestras las distancias euclídeas al cuadrado, y el método de Ward como método de unión de conglomerados.

| FORMULARIO EVALUACIÓN SENSORIAL DEL QUESO MANCHEGO | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------------|--|-------|--|----------|--|-----------|--------------|--------|------------------|--|-------|--|----------|--|-----------|--------|---------|--------|--|-------|--|----------|--|-----------|--------------|--------------|-------------|--|-------|--|----------|--|-----------|-----------|----------|-----------|--|-------|--|----------|--|-----------|----------|--------|------|--|-------|--|----------|--|-----------|--------------|---------|--|--|-------|--|----------|--|-----------|---------------|---------|--------------|
| JUEZ: | FECHA: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <ul style="list-style-type: none"> ASPECTO DEL CORTE: <table border="0"> <tr> <td></td> <td> ----- </td> <td></td> </tr> <tr> <td>0</td> <td></td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>-Coloración:</td> <td>Blanco</td> <td>Amarillo intenso</td> </tr> </table> <table border="0"> <tr> <td></td> <td> ----- </td> <td></td> </tr> <tr> <td>0</td> <td></td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>-Ojos:</td> <td>Ninguno</td> <td>Muchos</td> </tr> </table> OLOR: <table border="0"> <tr> <td></td> <td> ----- </td> <td></td> </tr> <tr> <td>0</td> <td></td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>-Intensidad:</td> <td>Poco intenso</td> <td>Muy intenso</td> </tr> </table> <table border="0"> <tr> <td></td> <td> ----- </td> <td></td> </tr> <tr> <td>0</td> <td></td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>-Calidad:</td> <td>Muy mala</td> <td>Excelente</td> </tr> </table> SENSACIÓN PERCIBIDA EN LA PRIMERA MORDIDA: <table border="0"> <tr> <td></td> <td> ----- </td> <td></td> </tr> <tr> <td>0</td> <td></td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>-Dureza:</td> <td>Blando</td> <td>Duro</td> </tr> </table> <table border="0"> <tr> <td></td> <td> ----- </td> <td></td> </tr> <tr> <td>0</td> <td></td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>-Fragilidad:</td> <td>Ninguna</td> <td>Muchas partículas pequeñas a la 1ª mordida</td> </tr> </table> <table border="0"> <tr> <td></td> <td> ----- </td> <td></td> </tr> <tr> <td>0</td> <td></td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>-Elasticidad:</td> <td>Ninguna</td> <td>Muy elástico</td> </tr> </table> | | | ----- | | 0 | | 10 | -Coloración: | Blanco | Amarillo intenso | | ----- | | 0 | | 10 | -Ojos: | Ninguno | Muchos | | ----- | | 0 | | 10 | -Intensidad: | Poco intenso | Muy intenso | | ----- | | 0 | | 10 | -Calidad: | Muy mala | Excelente | | ----- | | 0 | | 10 | -Dureza: | Blando | Duro | | ----- | | 0 | | 10 | -Fragilidad: | Ninguna | Muchas partículas pequeñas a la 1ª mordida | | ----- | | 0 | | 10 | -Elasticidad: | Ninguna | Muy elástico |
| | ----- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| -Coloración: | Blanco | Amarillo intenso | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ----- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| -Ojos: | Ninguno | Muchos | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ----- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| -Intensidad: | Poco intenso | Muy intenso | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ----- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| -Calidad: | Muy mala | Excelente | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ----- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| -Dureza: | Blando | Duro | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ----- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| -Fragilidad: | Ninguna | Muchas partículas pequeñas a la 1ª mordida | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ----- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| -Elasticidad: | Ninguna | Muy elástico | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Figura 4.1: Formulario para la evaluación sensorial del queso Manchego

• **SENSACIÓN PERCIBIDA CUANDO EL QUESO ESTÁ LISTO PARA TRAGAR:**

-Adherencia a los dientes: 0 10

No se adhiere Se adhiere algo a los dientes pero se desprende fácilmente Muy adherente

-Pastosidad/ Cremosidad: 0 10

• **ATRIBUTOS PERCIBIDOS EN CUALQUIER ETAPA Y POR CUALQUIER VÍA:**

-Grasiento: 0 10

-Con agua: 0 10

-Picante: 0 10

-Ácido: 0 10

-Salado: 0 10

-Amargo: 0 10

• **IMPRESIÓN GLOBAL:**

0 10

Mala Excelente

Figura 4.1 (continuación): Formulario para la evaluación sensorial del queso Manchego

Todos los tratamientos estadísticos se realizaron usando el programa estadístico SPSS para Windows, Versión 9.0.1.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Análisis microbiológico

Con el objetivo de conocer el comportamiento de las bacterias lácticas utilizadas para fabricar los tres lotes de quesos objeto de este estudio, se realizó el recuento de los diferentes géneros de bacterias lácticas así como de las bacterias viables totales, en la leche pasteurizada empleada en la fabricación de los quesos (antes y después de ser inoculada) y en los quesos elaborados madurados hasta los 150 días.

Hay que resaltar que a pesar de que se emplearon medios de cultivo selectivos para cada uno de los géneros de bacterias lácticas, éstos no resultaron serlo del todo, por lo que se encontraron algunas dificultades a la hora de efectuar los recuentos de una forma precisa, sobre todo en las primeras fechas de maduración.

4.3.1.1. Leche

Los recuentos de bacterias viables totales, de lactococos, leuconostocs y lactobacilos en la leche se presentan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Recuentos bacterianos (ufc mL^{-1}) en la leche utilizada en la elaboración de quesos Manchegos elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes (lote 1, lote 2 y lote 3).

| Microorganismos | Leche antes de ser inoculada | Leche inoculada | | |
|-------------------|------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 |
| Lactococos | <10 | $2,8 \times 10^8$ | $>3 \times 10^6$ | $2,7 \times 10^8$ |
| Leuconostocs | <10 | $3,9 \times 10^8$ | $>3 \times 10^6$ | $2,2 \times 10^8$ |
| Lactobacilos | <10 | <10 | $2,7 \times 10^6$ | <10 |
| Bacterias totales | $3,8 \times 10^3$ | 4×10^8 | 4×10^8 | $5,1 \times 10^9$ |

En la leche antes de ser inoculada los recuentos de lactococos, leuconostocs y lactobacilos fueron menores de 10 ufc/mL, y el recuento de bacterias viables totales fue de $3,8 \times 10^3$ ufc/mL, lo que refleja la eficacia de la pasteurización, que produjo una leche de buena calidad microbiológica. Cabe destacar que después de la inoculación de las leches para los lotes 1 y 3, en los cuales no se añadieron lactobacilos en el cultivo iniciador, los recuentos de éstos fueron menores de 10 ufc/mL, mientras que en la leche del lote 2 este valor fue de $2,7 \times 10^6$ ufc/mL.

También aparecieron recuentos de leuconostoc en la leche inoculada con el cultivo iniciador 3, el cual no los contenía. Esto pudo ser debido probablemente a una contaminación.

4.3.1.2. Queso

Los recuentos microbianos de lactococos, leuconostocs, lactobacilos y bacterias viables totales, en las muestras pertenecientes a los tres lotes de quesos Manchegos se muestran en la Figura 4.2.

Los recuentos de lactococos en los quesos de los lotes 1, 2 y 3 fueron inmediatamente después del prensado, alrededor de 10^8 - 10^9 ufc/g, y disminuyeron en aproximadamente 3 ciclos logarítmicos a los 150 días. Esta disminución fue más acusada para los quesos del lote 3 (elaborados con el cultivo comercial). Esto está de acuerdo con los resultados encontrados por otros autores en estudios previos en queso Cheddar (Martley y Lawrence, 1972; McSweeney *et al.*, 1993) y en queso Gouda (Visser, 1977), los cuales también observaron una disminución progresiva en la población de los lactococos hasta el final de la maduración.

Los leuconostoc experimentaron un fuerte descenso (entre 3 y 5 unidades logarítmicas) en los quesos de los lotes 1 y 2 desde el principio hasta el final de la maduración. Los quesos del lote 2 mostraron menores recuentos de leuconostocs durante la maduración que los quesos del lote 1, debido a la menor proporción a la que habían sido inoculados en la leche de partida.

Los recuentos de lactobacilos en los quesos del lote 2 (en el cual habían sido añadidos como adjunto del cultivo *starter*) fueron, inmediatamente después del prensado, del orden de 10^6 ufc/g y aumentaron durante la maduración hasta alcanzar 10^8 ufc/g desde los 45 días hasta el final de la maduración. Los quesos de los lotes 1 y 3 presentaron recuentos nulos de lactobacilos sólo inmediatamente después del prensado, alcanzando niveles de hasta 10^7 y 10^6 ufc/g, respectivamente, al final de la maduración. Esto es debido probablemente, a la contaminación producida posteriormente a la pasteurización, procedente de las instalaciones, el ambiente, el personal, utensilios, etc., ya que en ambos lotes no fueron añadidos lactobacilos como parte del cultivo iniciador. Se sabe que la fabricación de queso en cubas abiertas puede llevar a una interpretación errónea de los resultados, ya que los lactobacilos de la microbiota nativa y contaminante de la leche pueden crecer en una leche pasteurizada en la cual no han sido añadidos expresamente y alcanzar elevados recuentos (McSweeney *et al.*, 1994). Otros autores también encontraron valores similares a los hallados en este trabajo para los recuentos de lactobacilos al final de la maduración en queso Cheddar, al cual no se habían añadido lactobacilos en su elaboración (McSweeney *et al.*, 1993; McSweeney *et al.*, 1994; Lane y Fox, 1996; Lynch *et al.*, 1996; Lynch *et al.*, 1997). En el presente estudio, aunque los lactobacilos estuvieron presentes en los tres lotes de quesos estudiados, los recuentos en los quesos del lote 2 (a los cuales se habían añadido expresamente como adjunto del cultivo *starter*) fueron superiores a los otros dos lotes durante todo el proceso de maduración.

En cuanto a los recuentos de bacterias viables totales, éstos experimentaron un descenso general a lo largo de la maduración para los tres lotes de quesos elaborados, presentando recuentos finales del orden de 10^7 - 10^8 .

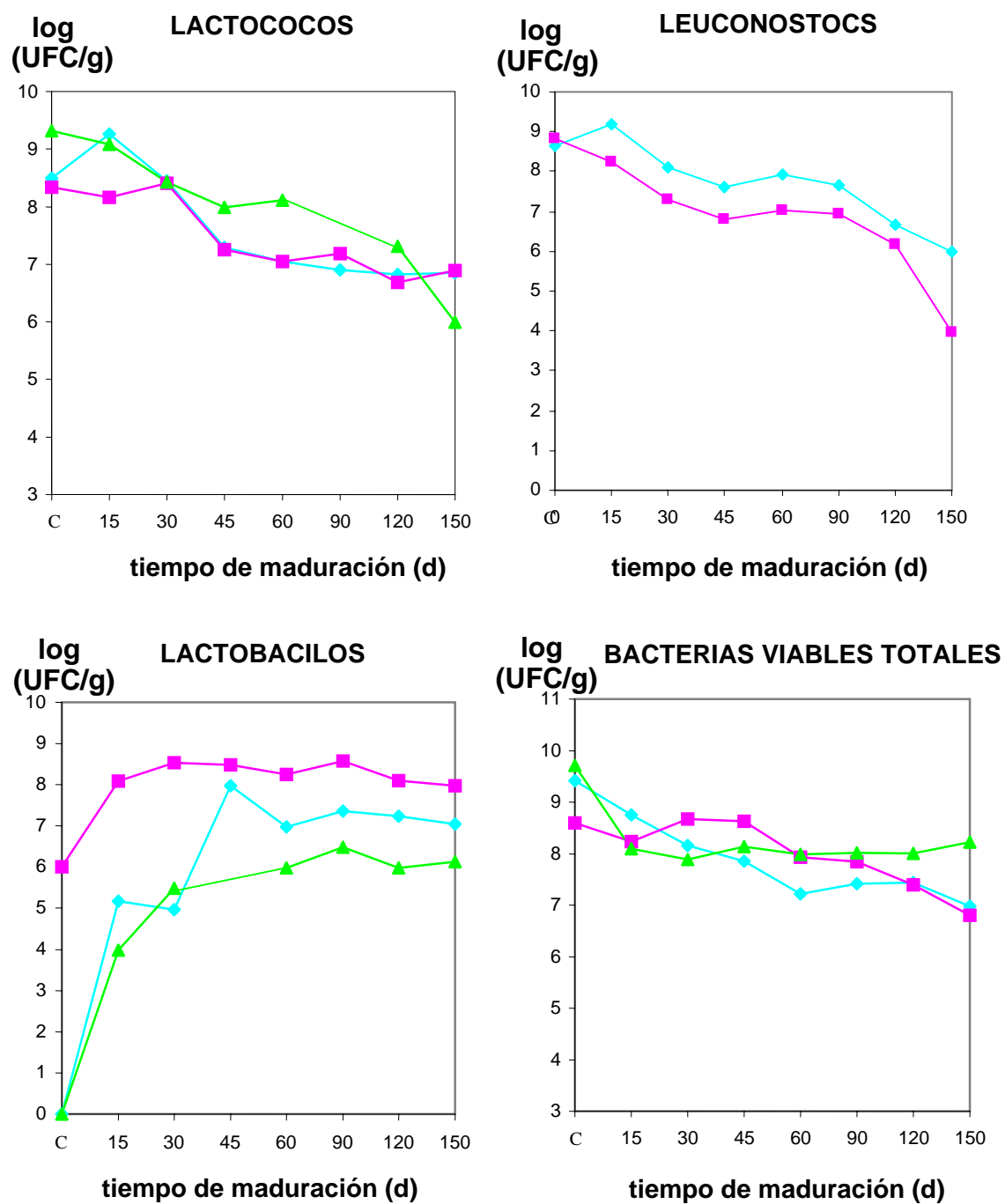


Figura 4.2.: Recuentos microbiológicos de lactococos, leuconostocs, lactobacilos y bacterias viables totales a lo largo de la maduración en los quesos Manchegos elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes:

—◆— lote 1 —■— lote 2 —▲— lote 3

C: Cuajada

4.3.2. Análisis físico-químicos

Los valores medios y las desviaciones estándar de extracto seco (ES), pH, actividad del agua (A_w), proteína total y cloruros de los tres lotes de quesos Manchegos se muestran en la Tabla 4.2 (A), así como los resultados del ANOVA considerando como factor el lote (o cultivo iniciador empleado). En la Figura 4.3 se muestra gráficamente la evolución del extracto seco, de la actividad del agua y del pH con el tiempo de maduración.

Los valores de ES mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres lotes de quesos en las primeras fechas de maduración (desde los 15 hasta los 60 días), siendo los quesos del lote 1 los que presentaron valores algo más elevados de ES. Al final de la maduración (150 días) los quesos alcanzaron valores similares de ES.

El pH presentó diferencias significativas entre lotes en la mayoría de las fechas estudiadas. Al final de la maduración, los quesos del lote 3 presentaron valores de pH significativamente más bajos que los otros dos lotes de quesos.

Los valores de A_w sólo presentaron diferencias significativas entre lotes a los 30 y a los 90 días de maduración.

El contenido en proteína total no mostró diferencias significativas entre los tres lotes, debido a que todos los quesos fueron elaborados con la misma leche de partida.

La concentración de cloruros no fue, en general, significativamente diferente para los tres lotes, si bien los quesos del lote 2 mostraron concentraciones algo mayores que los otros dos a los 30 y a los 90 días de maduración, debido posiblemente a que la fabricación de los quesos se realizó de forma semiartesanal.

Todos estos valores fueron similares a los observados para el queso Manchego por otros autores (Fontecha *et al.*, 1994; Picón *et al.*, 1995; García-Ruiz *et al.*, 1998).

A continuación se aplicó el ANOVA de un factor a estos mismos datos, considerando en este caso como factor, el tiempo de maduración, con el objetivo de observar las posibles diferencias existentes entre muestras con distintos tiempos de maduración. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.2 (B).

El test de Student-Newman-Keuls mostró que los valores de ES fueron diferentes significativamente para la mayoría de los tiempos de maduración en los tres lotes, aumentando desde valores en torno a 55-57% a los 15 días, hasta alcanzar, al final de la maduración, cantidades alrededor de 67-68%.

La *A_w* disminuyó con el tiempo de maduración en los tres lotes de muestras analizadas (tal y como era de esperar). Los valores también fueron significativamente diferentes entre las distintas fechas estudiadas.

El pH no mostró una tendencia clara con la maduración, sino que osciló entre 5,0-5,2 en general, para los tres lotes de quesos.

El nitrógeno proteico prácticamente no mostró variaciones significativas desde el inicio al final de la maduración y en cuanto a la concentración de cloruros sólo se encontraron diferencias significativas entre algunos tiempos de maduración en los lotes 1 y 2.

Estos resultados son coincidentes con los obtenidos para las muestras de queso Manchego elaboradas en invierno y en primavera, maduras durante los mismos períodos de tiempo, correspondientes al estudio realizado en el Capítulo 2 de esta Memoria.

TABLA 4.2 (A): Valores medios¹ y desviación estándar de las variables físico-químicas de los quesos Manchegos elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes.

| | Tiempo de maduración (días) | LOTE 1 | LOTE 2 | LOTE 3 |
|----------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| ES (%) | 15 | 56,82 ^a ± 0,26 | 56,91 ^a ± 1,23 | 54,42 ^b ± 0,75 |
| | 30 | 59,25 ^a ± 0,26 | 57,52 ^b ± 0,25 | 56,72 ^b ± 0,87 |
| | 45 | 58,96 ^a ± 0,75 | 57,99 ^a ± 0,54 | 56,54 ^b ± 0,69 |
| | 60 | 62,16 ^a ± 1,16 | 59,75 ^b ± 0,71 | 58,72 ^b ± 0,90 |
| | 90 | 64,78 ± 0,88 | 63,92 ± 0,63 | 63,08 ± 0,56 |
| | 120 | 65,73 ± 0,82 | 63,98 ± 1,32 | 63,67 ± 1,05 |
| | 150 | 67,36 ± 0,67 | 67,00 ± 0,65 | 67,73 ± 1,12 |
| pH | 15 | 5,001 ^a ± 0,027 | 5,182 ^b ± 0,034 | 5,107 ^c ± 0,047 |
| | 30 | 5,058 ^a ± 0,014 | 5,102 ^a ± 0,021 | 5,180 ^b ± 0,059 |
| | 45 | 5,138 ± 0,038 | 5,037 ± 0,017 | 5,054 ± 0,058 |
| | 60 | 5,095 ^a ± 0,018 | 5,103 ^a ± 0,039 | 4,979 ^b ± 0,020 |
| | 90 | 5,054 ± 0,067 | 5,122 ± 0,019 | 5,014 ± 0,036 |
| | 120 | 5,060 ^a ± 0,045 | 5,067 ^a ± 0,029 | 4,929 ^b ± 0,068 |
| | 150 | 5,184 ^a ± 0,034 | 5,170 ^a ± 0,008 | 5,079 ^b ± 0,059 |
| Aw | 15 | 0,962 ± 0,001 | 0,961 ± 0,003 | 0,970 ± 0,006 |
| | 30 | 0,958 ^a ± 0,002 | 0,955 ^a ± 0,001 | 0,966 ^b ± 0,005 |
| | 45 | 0,957 ± 0,002 | 0,950 ± 0,001 | 0,958 ± 0,009 |
| | 60 | 0,944 ± 0,001 | 0,942 ± 0,002 | 0,950 ± 0,008 |
| | 90 | 0,936 ^a ± 0,005 | 0,930 ^a ± 0,001 | 0,954 ^b ± 0,004 |
| | 120 | 0,929 ± 0,008 | 0,923 ± 0,004 | 0,936 ± 0,011 |
| | 150 | 0,925 ± 0,001 | 0,914 ± 0,003 | 0,920 ± 0,015 |
| Proteína (%ES) | 15 | 38,79 ± 0,19 | 38,15 ± 0,28 | 38,41 ± 0,29 |
| | 30 | 38,66 ± 0,12 | 37,67 ± 0,16 | 38,58 ± 0,80 |
| | 45 | 38,20 ± 0,28 | 37,64 ± 0,16 | 38,20 ± 0,61 |
| | 60 | 38,81 ± 0,15 | 39,06 ± 0,29 | 38,60 ± 0,36 |
| | 90 | 38,34 ± 0,35 | 37,85 ± 0,32 | 37,96 ± 0,27 |
| | 120 | 38,01 ± 0,29 | 37,51 ± 0,42 | 37,32 ± 0,84 |
| | 150 | 38,89 ± 0,59 | 38,07 ± 0,39 | 38,58 ± 0,28 |
| Cloruros (%ES) | 15 | 3,13 ± 0,22 | 3,71 ± 0,10 | 2,88 ± 0,93 |
| | 30 | 3,25 ^a ± 0,18 | 4,33 ^b ± 0,05 | 3,62 ^a ± 0,94 |
| | 45 | 3,35 ± 0,09 | 4,51 ± 0,22 | 3,82 ± 1,08 |
| | 60 | 3,61 ± 0,20 | 4,69 ± 0,16 | 3,60 ± 0,54 |
| | 90 | 3,77 ^a ± 0,18 | 4,73 ^b ± 0,08 | 2,72 ^c ± 0,30 |
| | 120 | 3,81 ± 0,30 | 4,96 ± 0,12 | 4,05 ± 1,21 |
| | 150 | 3,69 ± 0,16 | 4,76 ± 0,10 | 4,05 ± 1,27 |

¹: Cada valor corresponde a la media del análisis por duplicado, realizado a su vez en tres quesos independientes.

^{a,b,c}: Medias en la misma **fila** con superíndices distintos son significativamente diferentes entre sí según el test de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

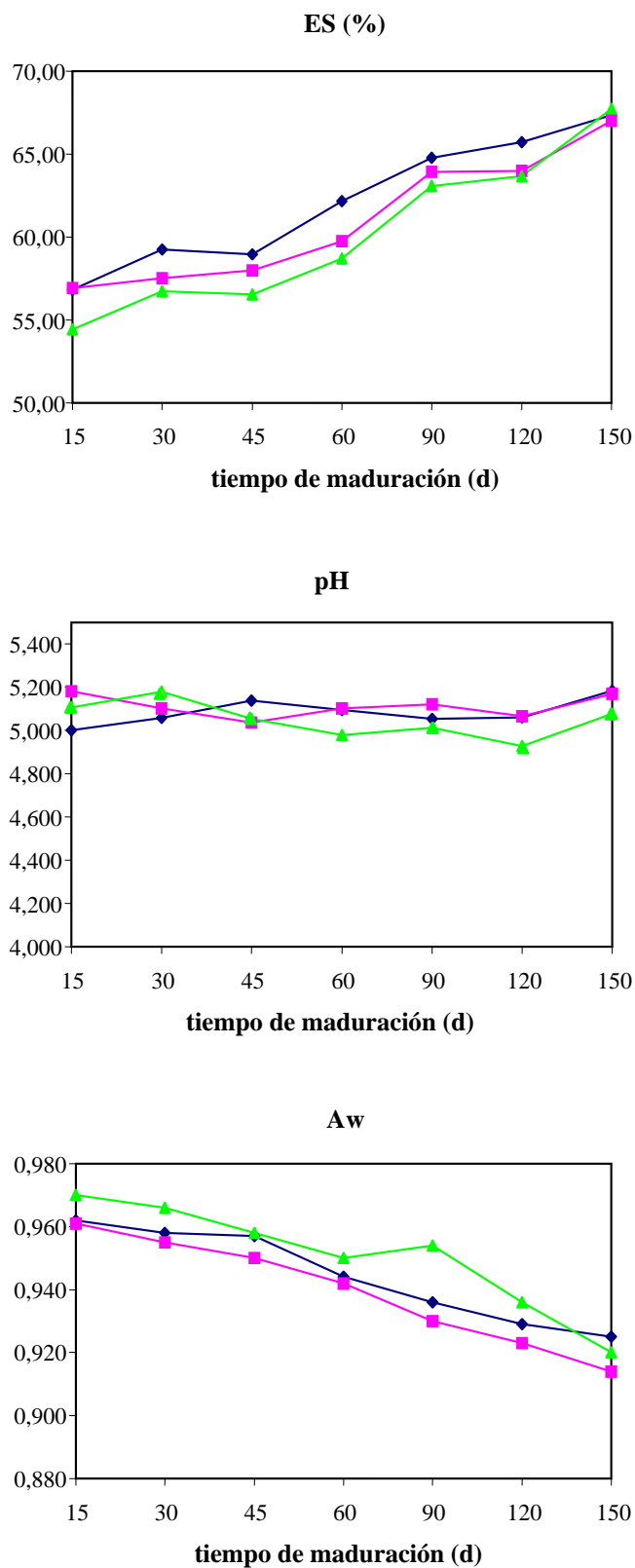


Figura 4.3: Evolución del ES, pH y Aw a lo largo de la maduración de los quesos Manchegos elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes: —◆— lote 1 —■— lote 2 —▲— lote 3

TABLA 4.2 (B): Valores medios¹ y desviación estándar de la composición de los quesos Manchegos elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes.

| | | Tiempo de maduración (días) | | | | | | | | | |
|--------|----------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--|--|--|
| | | 15 | 30 | 45 | 60 | 90 | 120 | 150 | | | |
| Lote 1 | ES (%) | 56,82 ^a ± 0,26 | 59,25 ^b ± 0,26 | 58,96 ^b ± 0,75 | 62,16 ^c ± 1,16 | 64,78 ^d ± 0,88 | 65,73 ^d ± 0,82 | 67,36 ^e ± 0,67 | | | |
| | pH | 5,001 ^{a,b} ± 0,027 | 5,058 ^{a,b} ± 0,014 | 5,138 ^{a,b} ± 0,038 | 5,095 ^{a,b} ± 0,018 | 5,054 ^{a,b} ± 0,067 | 5,060 ^a ± 0,045 | 5,184 ^b ± 0,034 | | | |
| | Aw | 0,962 ^a ± 0,001 | 0,958 ^{a,b} ± 0,002 | 0,957 ^b ± 0,002 | 0,944 ^c ± 0,001 | 0,936 ^c ± 0,005 | 0,929 ^d ± 0,008 | 0,925 ^e ± 0,001 | | | |
| | Proteína | 38,79 ^a ± 0,19 | 38,66 ^a ± 0,12 | 38,20 ^a ± 0,28 | 38,81 ^a ± 0,15 | 38,34 ^a ± 0,35 | 38,01 ^a ± 0,29 | 38,89 ^a ± 0,59 | | | |
| | Cloruros | 3,13 ^a ± 0,22 | 3,25 ^{a,b} ± 0,18 | 3,35 ^{a,b,c} ± 0,09 | 3,61 ^{b,c} ± 0,20 | 3,77 ^c ± 0,18 | 3,81 ^c ± 0,30 | 3,69 ^{b,c} ± 0,16 | | | |
| Lote 2 | ES (%) | 56,91 ^a ± 1,23 | 57,52 ^a ± 0,25 | 57,99 ^a ± 0,54 | 59,75 ^b ± 0,71 | 63,92 ^c ± 0,63 | 63,98 ^c ± 1,32 | 67,00 ^d ± 0,65 | | | |
| | pH | 5,182 ^a ± 0,034 | 5,102 ^b ± 0,021 | 5,037 ^c ± 0,017 | 5,103 ^b ± 0,039 | 5,122 ^b ± 0,019 | 5,067 ^{b,c} ± 0,029 | 5,170 ^a ± 0,008 | | | |
| | Aw | 0,961 ^a ± 0,003 | 0,955 ^b ± 0,001 | 0,950 ^c ± 0,001 | 0,942 ^d ± 0,002 | 0,930 ^c ± 0,001 | 0,923 ^f ± 0,004 | 0,914 ^g ± 0,003 | | | |
| | Proteína | 38,15 ^a ± 0,28 | 37,67 ^a ± 0,16 | 37,64 ^a ± 0,16 | 39,06 ^b ± 0,29 | 37,85 ^a ± 0,32 | 37,51 ^a ± 0,42 | 38,07 ^a ± 0,39 | | | |
| | Cloruros | 3,71 ^a ± 0,10 | 4,33 ^b ± 0,05 | 4,51 ^{b,c} ± 0,22 | 4,69 ^{c,d} ± 0,16 | 4,73 ^{c,d} ± 0,08 | 4,96 ^d ± 0,12 | 4,76 ^{c,d} ± 0,10 | | | |
| Lote 3 | ES (%) | 54,42 ^a ± 0,75 | 56,72 ^a ± 0,87 | 56,54 ^a ± 0,69 | 58,72 ^b ± 0,90 | 63,08 ^c ± 0,56 | 63,67 ^c ± 1,05 | 67,73 ^d ± 1,12 | | | |
| | pH | 5,107 ^{a,b} ± 0,047 | 5,180 ^a ± 0,059 | 5,054 ^{b,c,d} ± 0,058 | 4,979 ^{c,d} ± 0,020 | 5,014 ^{b,c,d} ± 0,036 | 4,929 ^d ± 0,068 | 5,079 ^{a,b,c} ± 0,059 | | | |
| | Aw | 0,970 ^a ± 0,006 | 0,966 ^a ± 0,005 | 0,958 ^a ± 0,009 | 0,950 ^{a,b} ± 0,008 | 0,954 ^{ab} ± 0,004 | 0,936 ^{b,c} ± 0,011 | 0,920 ^c ± 0,015 | | | |
| | Proteína | 38,41 ^a ± 0,29 | 38,58 ^a ± 0,80 | 38,20 ^a ± 0,61 | 38,60 ^a ± 0,36 | 37,96 ^a ± 0,27 | 37,32 ^a ± 0,84 | 38,58 ^a ± 0,28 | | | |
| | Cloruros | 2,88 ^a ± 0,93 | 3,62 ^a ± 0,94 | 3,82 ^a ± 1,08 | 3,60 ^a ± 0,54 | 2,72 ^a ± 0,30 | 4,05 ^a ± 1,21 | 4,05 ^a ± 1,27 | | | |

¹: Cada valor corresponde a la media del análisis por duplicado, realizado a su vez en tres quesos independientes.a,b,c: Medias en la misma **fila** con superíndices distintos son significativamente diferentes entre sí según el test de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

4.3.3. Electroforesis en gel de urea-poliacrilamida

Se realizó la electroforesis en gel de urea-poliacrilamida de la fracción insoluble en agua a pH 4,6 de todas las muestras de los quesos de 90 días de maduración, elaborados con los tres cultivos iniciadores diferentes (Figura 4.4), con el objetivo de observar, en primer lugar, si existían diferencias entre los tres quesos independientes dentro de un mismo lote, y luego estudiar las posibles diferencias entre lotes. Una vez comprobado que no existían diferencias dentro de un mismo lote de quesos, se realizó la electroforesis de las muestras de quesos a los distintos tiempos de maduración (15, 30, 45, 90 y 150 días), considerando solamente una muestra por lote (Figura 4.5).

No se realizó cuantificación densitométrica de las bandas electroforéticas, ya que la electroforesis es una técnica más bien cualitativa que cuantitativa, y lo que se pretendía era observar la evolución de la proteólisis de estos quesos.

Los electroforegramas mostraron una degradación de las caseínas a lo largo de la maduración típica para el queso Manchego. La mayor parte de la β -caseína permaneció intacta, mostrando solamente una ligera degradación al final del período de maduración. Esto es propio de los quesos de leche de oveja en general, en los cuales la β -caseína presenta cierta resistencia a la hidrólisis (Marcos *et al.*, 1978). En el caso del queso Manchego, esta baja degradación de la β -caseína con la maduración ha sido observada por diversos autores (Ramos *et al.*, 1981; Fontecha *et al.*, 1994; García-Ruiz *et al.*, 1998).

Se comprobó que la α_s -caseína fue degradada mucho más extensamente que la β -caseína a lo largo de la maduración, y las bandas correspondientes a sus productos de degradación (α_s -cn degr.) aumentaron en intensidad según avanzaba la maduración.

Las bandas correspondientes a las γ -caseínas, las cuales son productos de degradación de la β -caseína por la acción de la plasmina, también experimentaron un aumento de su intensidad a lo largo de la maduración.

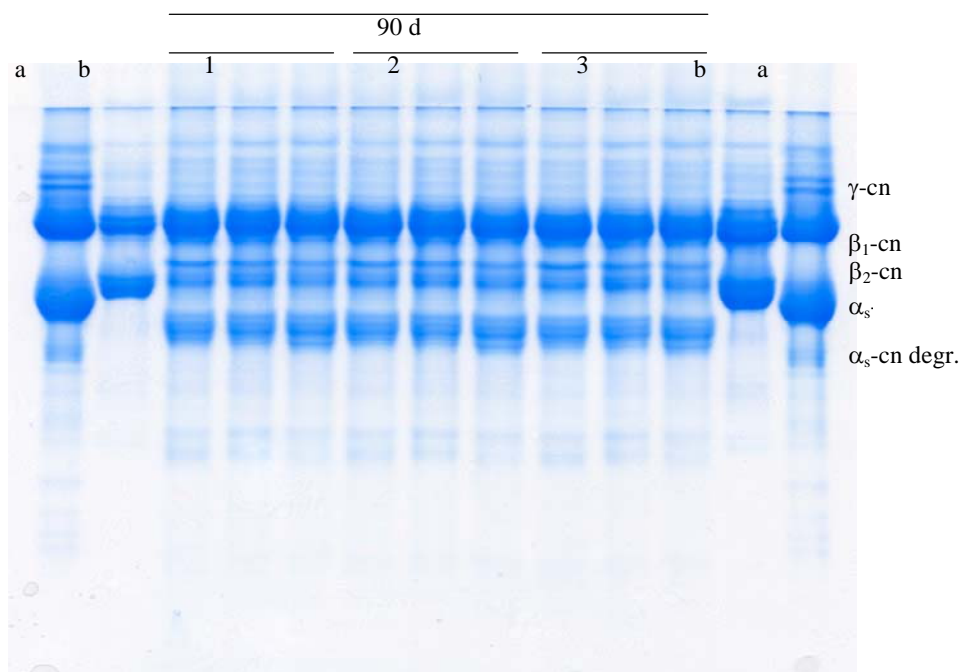


Figura 4.4: Electroforegramas de la fracción insoluble a pH 4,6 de los quesos de 90 días de maduración elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes (1, 2 y 3)

a: caseinato sódico

b: caseína ovina

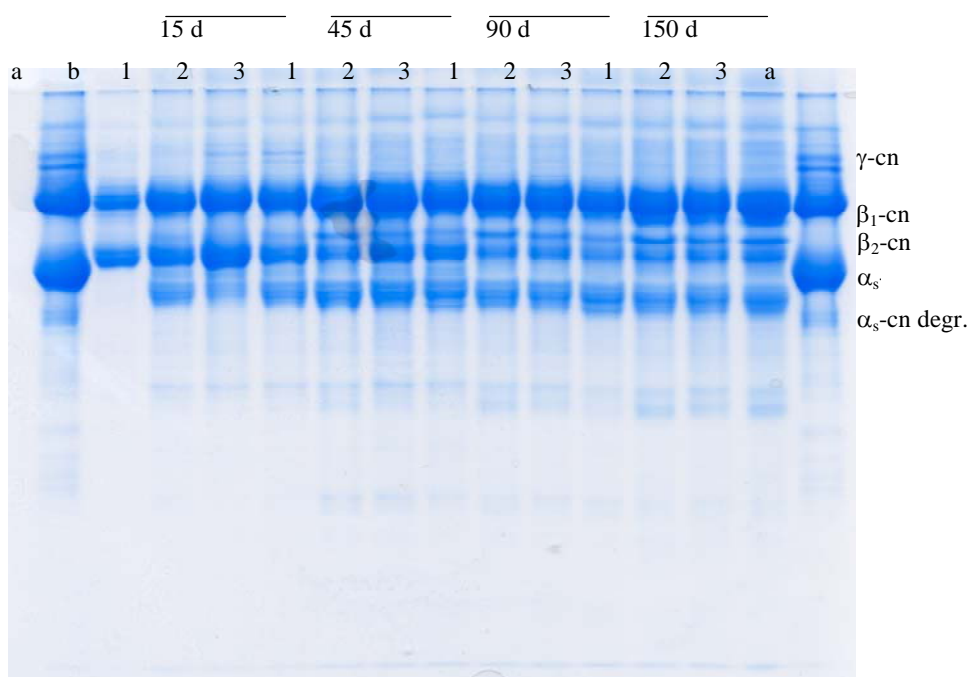


Figura 4.5: Electroforegramas de la fracción insoluble a pH 4,6 de los quesos de 15, 45, 90 y 150 días de maduración elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes (1, 2 y 3)

a: caseinato sódico

b: caseína ovina

No se apreciaron diferencias cualitativas entre los electroforegramas de los tres lotes de quesos para cada tiempo de maduración. Esto era de esperar, ya que los agentes responsables de la proteólisis a este nivel (proteólisis primaria) son el cuajo y la plasmina (McSweeney *et al.*, 1994), mientras que las peptidasas de los lactococos y de las NSLAB del *starter* actúan sobre los péptidos liberados en la proteólisis primaria (Wallace y Fox, 1997), produciéndose así la proteólisis secundaria.

Otros autores, en estudios realizados en queso Cheddar elaborados con y sin cultivos adjuntos de lactobacilos, tampoco encontraron diferencias en los geles de urea-PAGE entre los quesos que contenían lactobacilos y los quesos control (McSweeney *et al.*, 1994; Lane y Fox, 1996; Lynch *et al.*, 1996).

4.3.4. Fracciones nitrogenadas

Las Tablas 4.3 (A) y 4.3 (B) muestran los valores de las fracciones nitrogenadas nitrógeno soluble en agua (NS) y nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico (N-PTA), así como las relaciones $NS/NT \times 100$ y $N-PTA/NT \times 100$, consideradas como índices de la proteólisis. También aparecen los resultados del ANOVA considerando como factor el lote (Tabla 4.3 (A)) y el tiempo de maduración (Tabla 4.3 (B)). En la Figura 4.6 se representa la evolución de estos índices con el tiempo de maduración.

Según puso de manifiesto el Test de Student-Newman-Keuls, no existieron diferencias significativas entre los valores de NS de los quesos elaborados con distintos cultivos iniciadores, a excepción de las muestras de 15 y 45 días del lote 2 (Tabla 4.3 (A)). Esto es debido a que, aunque los compuestos nitrogenados solubles del queso pueden ser producidos por las bacterias del *starter* y por la plasmina, son producidos fundamentalmente por la acción del cuajo (Visser, 1977).

Lynch *et al.* (1996), en un estudio realizado sobre la utilización de lactobacilos adjuntos en queso Cheddar, también encontraron niveles similares de NS en los quesos elaborados con y sin lactobacilos adjuntos del *starter*.

Por otro lado, en cuanto a la evolución con el tiempo de maduración, las concentraciones de NS, así como el índice $NS/NT \times 100$, aumentaron de forma significativa a medida que los quesos maduraban (Tabla 4.3 (B)) debido a la acción desarrollada por los agentes proteolíticos que intervienen en la maduración del queso. Así, las cantidades de NS aumentaron desde valores en torno a 0,6 (en % ES) a los 15 días hasta alcanzar valores alrededor de 1,3 (%ES) a los 150 días, para los tres lotes de quesos. La relación $NS/NT \times 100$ presentó unos valores al comienzo de la maduración (15 días) en torno al 10% para los tres lotes de quesos, alcanzando a los 150 días valores que oscilaron en torno al 21%.

Estos valores de la relación $NS/NT \times 100$ obtenidos para los tres lotes de quesos Manchegos elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes fueron similares a los obtenidos para los quesos Manchegos elaborados en primavera con un cultivo iniciador mixto comercial, y analizados a los mismos períodos de tiempo que aparecen en el Capítulo 2 de esta Memoria, y algo inferiores a los encontrados en los quesos del lote de invierno, elaborados y madurados de la misma forma.

En cuanto al N-PTA, no existieron diferencias significativas en ningún caso entre los tres tipos de quesos elaborados con diferentes cultivos iniciadores (Tabla 4.3. (A)). Esto concuerda con Lane y Fox (1996), en un estudio realizado en queso Cheddar sobre la utilización de lactobacilos como adjuntos del *starter*, donde se puso de manifiesto que las proteinasas del *starter* (lactococos) eran los principales agentes que contribuían a la producción de péptidos pequeños y aminoácidos libres. En dicho estudio, la actividad peptidásica de los lactobacilos adjuntos fue enmascarada por las bacterias del *starter*, es decir, por los lactococos, cuyo sistema peptidásico es capaz de degradar un amplio rango de péptidos de medio y pequeño tamaño a aminoácidos.

En el presente estudio, el hecho de que no se observaran diferencias en cuanto a las cantidades de N-PTA producidas en los tres lotes de quesos podría ser debido, en primer lugar, a que se produjo una proliferación inevitable de lactobacilos en los quesos de los lotes 1 y 3 (que no contenían lactobacilos en el cultivo iniciador) (ver Figura 4.2), y por otro lado, se podría haber producido este efecto de enmascaramiento de la actividad

TABLA 4.3 (A): Valores medios¹ y desviación estándar de las **fracciones nitrogenadas** de los quesos Manchegos elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes (lotes 1, 2 y 3).

| | Tiempo de maduración (días) | LOTE 1 | LOTE 2 | LOTE 3 |
|-------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| NS (g/100g ES) | 15 | 0,63 ^a ± 0,02 | 0,52 ^b ± 0,06 | 0,57 ^{a,b} ± 0,03 |
| | 30 | 0,82 ± 0,06 | 0,63 ± 0,08 | 0,63 ± 0,12 |
| | 45 | 0,95 ^a ± 0,03 | 0,85 ^b ± 0,05 | 0,96 ^a ± 0,04 |
| | 60 | 1,04 ± 0,03 | 1,05 ± 0,01 | 1,06 ± 0,08 |
| | 90 | 1,13 ± 0,07 | 1,10 ± 0,05 | 1,05 ± 0,07 |
| | 120 | 1,21 ± 0,15 | 1,22 ± 0,06 | 1,26 ± 0,05 |
| | 150 | 1,38 ± 0,05 | 1,30 ± 0,02 | 1,27 ± 0,05 |
| N-PTA (g/100g ES) | 15 | 0,06 ± 0,05 | 0,01 ± 0,02 | 0,01 ± 0,00 |
| | 30 | 0,04 ± 0,02 | 0,03 ± 0,01 | 0,04 ± 0,02 |
| | 45 | 0,07 ± 0,02 | 0,05 ± 0,03 | 0,09 ± 0,01 |
| | 60 | 0,12 ± 0,01 | 0,09 ± 0,02 | 0,08 ± 0,03 |
| | 90 | 0,13 ± 0,01 | 0,11 ± 0,03 | 0,13 ± 0,01 |
| | 120 | 0,16 ± 0,01 | 0,14 ± 0,02 | 0,15 ± 0,01 |
| | 150 | 0,19 ± 0,03 | 0,16 ± 0,00 | 0,20 ± 0,02 |
| NS/NT x 100 | 15 | 10,37 ± 0,40 | 8,67 ± 1,03 | 9,47 ± 0,64 |
| | 30 | 13,55 ± 1,49 | 10,75 ± 2,51 | 10,47 ± 4,00 |
| | 45 | 15,91 ^a ± 0,42 | 14,41 ^b ± 0,83 | 16,05 ^a ± 0,49 |
| | 60 | 17,15 ± 0,45 | 17,13 ± 0,22 | 17,50 ± 1,33 |
| | 90 | 18,74 ± 1,08 | 18,47 ± 0,84 | 17,63 ± 1,08 |
| | 120 | 20,27 ± 2,41 | 20,82 ± 0,78 | 21,58 ± 0,54 |
| | 150 | 22,61 ± 0,82 | 21,81 ± 0,52 | 20,97 ± 0,71 |
| N-PTA/NT x 100 | 15 | 0,97 ± 0,84 | 0,20 ± 0,34 | 0,15 ± 0,00 |
| | 30 | 0,60 ± 0,35 | 0,49 ± 0,17 | 0,58 ± 0,29 |
| | 45 | 1,13 ± 0,38 | 0,78 ± 0,43 | 1,43 ± 0,22 |
| | 60 | 1,90 ± 0,24 | 1,41 ± 0,34 | 1,40 ± 0,47 |
| | 90 | 2,14 ± 0,14 | 2,29 ± 0,15 | 2,13 ± 0,14 |
| | 120 | 2,73 ± 0,16 | 2,31 ± 0,35 | 2,55 ± 0,25 |
| | 150 | 3,17 ± 0,43 | 2,67 ± 0,03 | 3,25 ± 0,34 |

¹: Cada valor corresponde a la media del análisis de tres quesos independientes realizado a su vez por duplicado.

^{a, b}: Medias en la misma **fila** con superíndices distintos son significativamente diferentes entre sí según el test de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

TABLA 4.3 (B): Valores medios¹ y desviación estándar de las **fracciones nitrogenadas** de los quesos Manchegos elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes (lotes 1, 2 y 3).

| | Tiempo de maduración (días) | LOTE 1 | LOTE 2 | LOTE 3 |
|-------------------|-----------------------------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| NS (g/100g ES) | 15 | 0,63 ^a ± 0,02 | 0,52 ^b ± 0,06 | 0,57 ^{a,b} ± 0,03 |
| | 30 | 0,82 ^b ± 0,06 | 0,63 ^a ± 0,08 | 0,63 ^a ± 0,12 |
| | 45 | 0,95 ^c ± 0,03 | 0,85 ^b ± 0,05 | 0,96 ^a ± 0,04 |
| | 60 | 1,04 ^c ± 0,03 | 1,05 ^a ± 0,01 | 1,06 ^a ± 0,08 |
| | 90 | 1,13 ^d ± 0,07 | 1,10 ^a ± 0,05 | 1,05 ^a ± 0,07 |
| | 120 | 1,21 ^e ± 0,15 | 1,22 ^a ± 0,06 | 1,26 ^a ± 0,05 |
| | 150 | 1,38 ^f ± 0,05 | 1,30 ^a ± 0,02 | 1,27 ^a ± 0,05 |
| N-PTA (g/100g ES) | 15 | 0,06 ^{a,b} ± 0,05 | 0,01 ^a ± 0,02 | 0,01 ^a ± 0,00 |
| | 30 | 0,04 ^a ± 0,02 | 0,03 ^a ± 0,01 | 0,04 ^a ± 0,02 |
| | 45 | 0,07 ^{a,b,c} ± 0,02 | 0,05 ^a ± 0,03 | 0,09 ^b ± 0,01 |
| | 60 | 0,12 ^{b,c} ± 0,01 | 0,09 ^b ± 0,02 | 0,08 ^b ± 0,03 |
| | 90 | 0,13 ^{c,d} ± 0,01 | 0,11 ^{b,c} ± 0,03 | 0,13 ^c ± 0,01 |
| | 120 | 0,16 ^{d,e} ± 0,01 | 0,14 ^c ± 0,02 | 0,15 ^c ± 0,01 |
| | 150 | 0,19 ^e ± 0,03 | 0,16 ^c ± 0,00 | 0,20 ^d ± 0,02 |
| NS/NT x 100 | 15 | 10,37 ^a ± 0,40 | 8,67 ^a ± 1,03 | 9,47 ^a ± 0,64 |
| | 30 | 13,55 ^b ± 1,49 | 10,75 ^b ± 2,51 | 10,47 ^a ± 4,00 |
| | 45 | 15,91 ^c ± 0,42 | 14,41 ^c ± 0,83 | 16,05 ^b ± 0,49 |
| | 60 | 17,15 ^{c,d} ± 0,45 | 17,13 ^d ± 0,22 | 17,50 ^{b,a} ± 1,33 |
| | 90 | 18,74 ^{d,e} ± 1,08 | 18,47 ^d ± 0,84 | 17,63 ^b ± 1,08 |
| | 120 | 20,27 ^e ± 2,41 | 20,82 ^e ± 0,78 | 21,58 ^c ± 0,54 |
| | 150 | 22,61 ^f ± 0,82 | 21,81 ^e ± 0,52 | 20,97 ^c ± 0,71 |
| N-PTA/NT x 100 | 15 | 0,97 ^a ± 0,84 | 0,20 ^a ± 0,34 | 0,15 ^a ± 0,00 |
| | 30 | 0,60 ^a ± 0,35 | 0,49 ^a ± 0,17 | 0,58 ^a ± 0,29 |
| | 45 | 1,13 ^a ± 0,38 | 0,78 ^a ± 0,43 | 1,43 ^b ± 0,22 |
| | 60 | 1,90 ^b ± 0,24 | 1,41 ^b ± 0,34 | 1,40 ^b ± 0,47 |
| | 90 | 2,14 ^b ± 0,14 | 2,29 ^c ± 0,15 | 2,13 ^c ± 0,14 |
| | 120 | 2,73 ^{b,c} ± 0,16 | 2,31 ^c ± 0,35 | 2,55 ^c ± 0,25 |
| | 150 | 3,17 ^c ± 0,43 | 2,67 ^c ± 0,03 | 3,25 ^d ± 0,34 |

¹: Cada valor corresponde a la media del análisis de tres quesos independientes realizado a su vez por duplicado.

^{a, b}: Medias en la misma **columna** con superíndices distintos son significativamente diferentes entre sí según el test de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

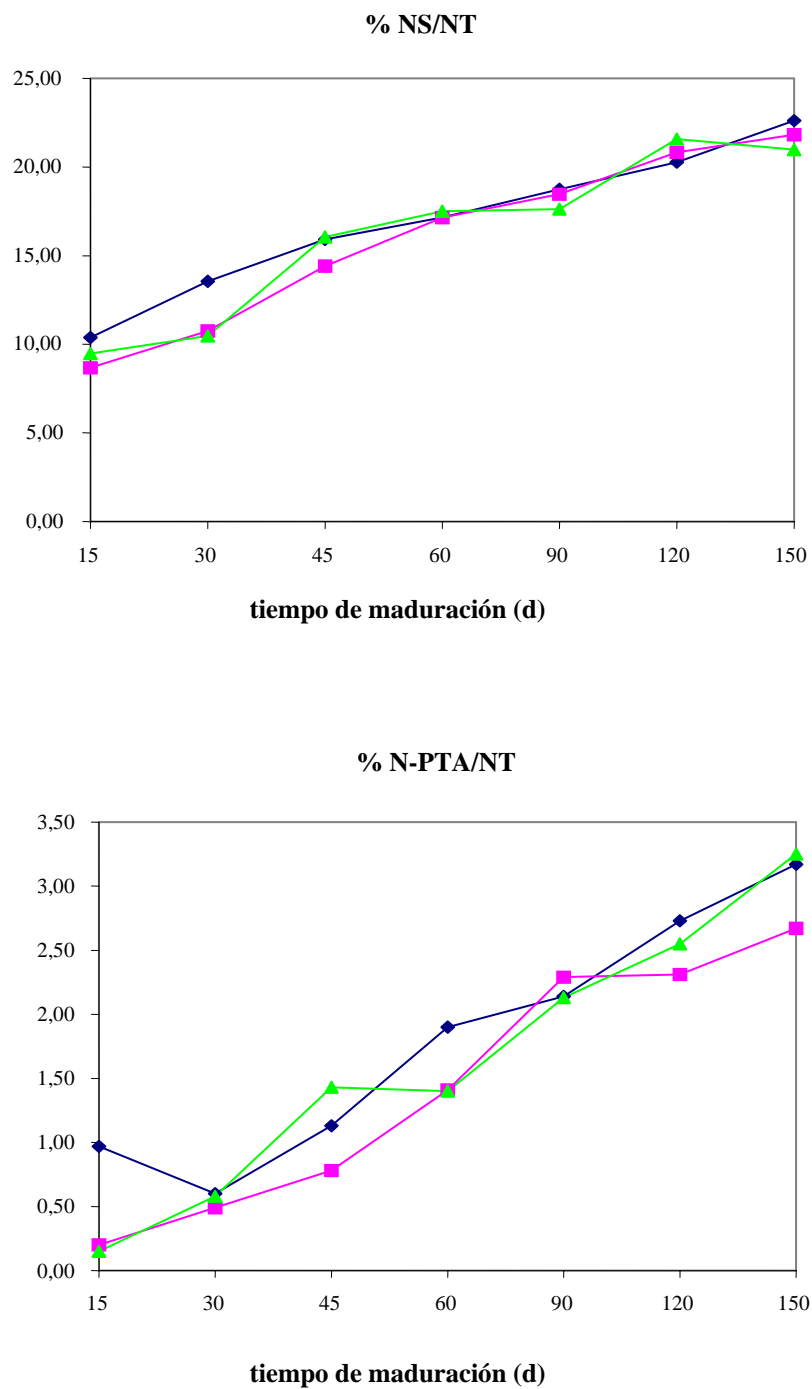


Figura 4.6: Evolución a lo largo de la maduración de los índices de proteolisis nitrógeno soluble en agua (NS) y nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico (N-PTA) referidos a nitrógeno total (NT) para los quesos Manchegos elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes:

—◆— lote 1 —■— lote 2 —▲— lote 3

peptidásica de los lactobacilos por parte de las cepas de lactococos del *starter*, ya que éstos estaban en mayor proporción en el cultivo iniciador.

Sin embargo, Lynch *et al.* (1996), en un estudio en queso Cheddar encontraron valores superiores de nitrógeno aminoacídico (comparable a la fracción de N-PTA) en los quesos que contenían lactobacilos añadidos como adjuntos del *starter* respecto a los quesos control.

Al igual que en el caso del NS, también se produjo un aumento significativo del N-PTA con el tiempo de maduración (Tabla 4.3 (B)). Así los valores oscilaron entre 0,01 y 0,06 (%ES) a los 15 días de maduración, y entre 0,16 y 0,20 (%ES) a los 150 días, para los tres lotes de quesos. Sólo se encontraron diferencias significativas en el lote 1.

La relación $N\text{-PTA}/NT \times 100$ (Fig. 4.6) fue casi nula al principio de la maduración para los tres lotes de quesos analizados y aumentó significativamente hasta valores en torno al 3% del NT al final de la maduración.

Estos valores de $N\text{-PTA}/NT \times 100$ fueron en general, similares a los observados para los quesos del lote de primavera y de nuevo algo inferiores a los del lote de quesos elaborados en invierno (Capítulo 2 de esta Memoria).

4.3.5. Análisis de los péptidos de las fracciones insoluble y soluble en etanol al 70% por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

El estudio de las fracciones insoluble y soluble en etanol al 70% se realizó en primer lugar en todos los quesos de 90 días de maduración; así, se analizaron todas las muestras de los tres lotes de quesos para esta fecha (9 muestras en total), con el fin de comprobar si existían diferencias entre los perfiles cromatográficos de los tres quesos independientes pertenecientes a un mismo lote, es decir, elaborados con el mismo cultivo iniciador. Este estudio se realizó solamente para una fecha de maduración debido a la dificultad de analizar el elevado número de quesos elaborados (63 en total) y se eligió la fecha de 90 días por ser un tiempo de maduración intermedio, y porque a los 90 días se

considera que los quesos ya han experimentado cambios notables debidos a la maduración. Posteriormente se realizó el estudio por tiempos de maduración, analizandose las muestras de 15, 45, 90 y 150 días.

4.3.5.1. Fracción de nitrógeno insoluble en etanol al 70%

En las Figuras 4.7, 4.8 y 4.9 se presentan los cromatogramas de la fracción insoluble en etanol al 70% de los tres quesos Manchegos de 90 días elaborados en cada uno de los tres lotes (lotes 1, 2 y 3). Por comparación visual de los cromatogramas se comprobó que no existían diferencias entre los perfiles peptídicos de los tres quesos dentro de un mismo lote; sin embargo, sí se apreciaron diferencias entre los distintos lotes, fundamentalmente para los picos con tiempos de elución desde el minuto 25 hasta el final del cromatograma. Lynch *et al.* (1996) sólo encontraron pequeñas diferencias entre los perfiles de RP-HPLC de la misma fracción de quesos Cheddar elaborados con y sin lactobacilos como adjuntos del cultivo *starter*.

Para interpretar estos perfiles peptídicos de una forma estadística, se aplicó el Análisis de Componentes Principales (ACP) a los cromatogramas de las muestras de quesos de 90 días. Los tres primeros componentes principales (CP) explicaron el 92,1% de la varianza total (Tabla 4.4). Las variables (o picos) que mejor se correlacionaron con cada CP y sus coeficientes también se muestran en la misma tabla. La Figura 4.10 muestra la distribución de las muestras en el plano definido por el CP 1 y el CP 2. Las muestras aparecen separadas en tres grupos, coincidiendo con los tres lotes de quesos elaborados con distintos cultivos iniciadores, y dentro de cada grupo se encuentran las tres muestras de quesos individuales. A la vista de estos resultados se puede decir que, los quesos elaborados con el mismo cultivo iniciador presentaron el mismo perfil de péptidos de la fracción insoluble en etanol al 70%, y por otro lado, que las muestras se separaron, en base a su perfil de péptidos de la fracción insoluble en etanol al 70%, según el cultivo *starter* empleado en su fabricación. Las muestras situadas en la parte positiva del CP 1 (lote 3) presentaron mayores cantidades de los péptidos 6, 9, 20, 18, 45, 11 y 8 (ordenados según su coeficiente de correlación con el CP1 (ver Tabla 4.4), mientras que las muestras localizadas en la parte negativa de este eje (muestras del lote 2) presentaron menores

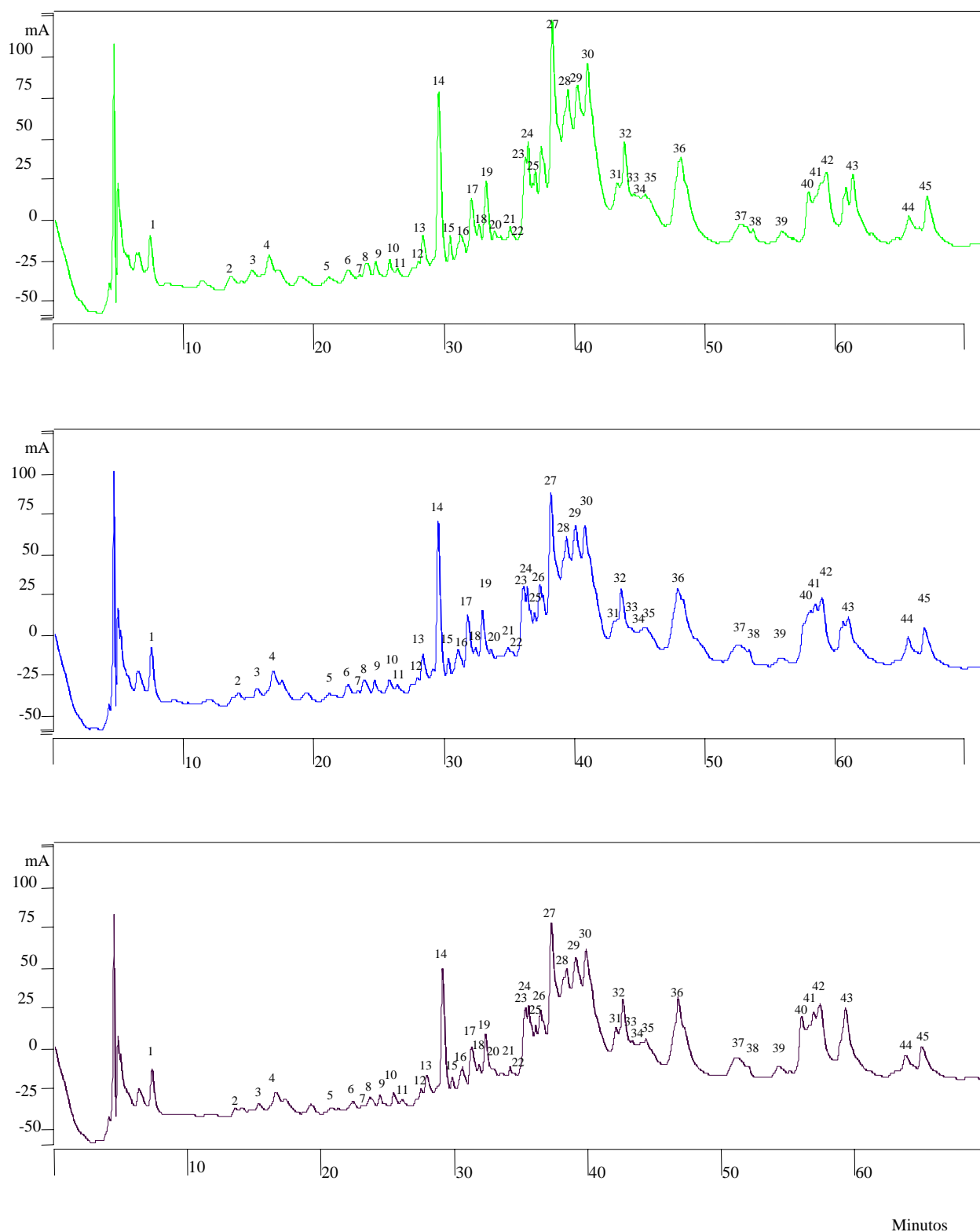
EtOH-Insoluble 90 días Lote 1

Figura 4.7: RP-HPLC cromatogramas de la fracción de NS insoluble en etanol al 70% de los tres quesos Manchegos de 90 días de maduración, elaborados con el cultivo iniciador 1 (Lote 1).

EtOH-Insoluble 90 d Lote 2

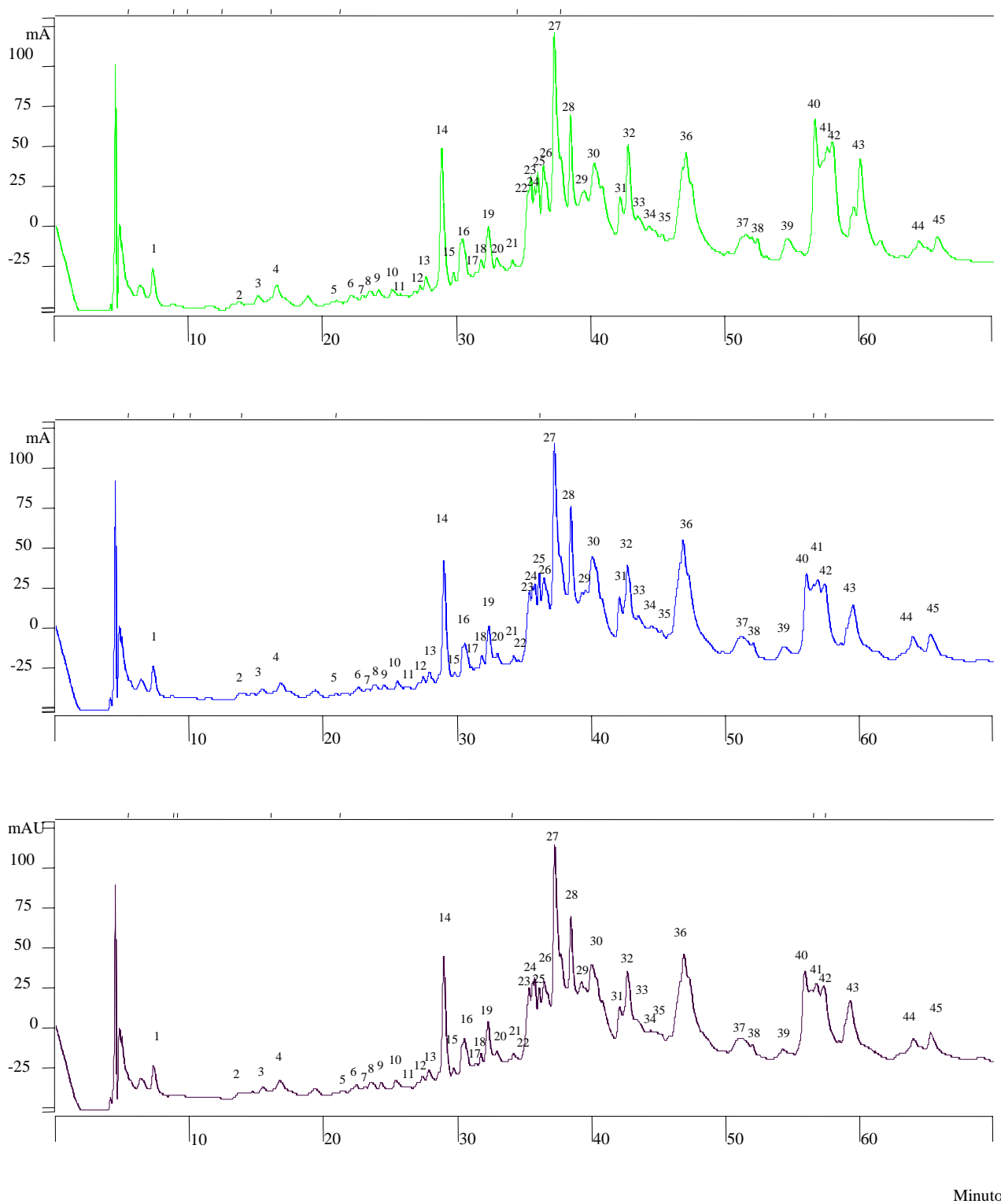


Figura 4.8: **RP-HPLC** cromatogramas de la fracción de NS insoluble en etanol al 70% de los tres quesos Manchegos de 90 días de maduración, elaborados con el cultivo iniciador 2 (Lote 2).

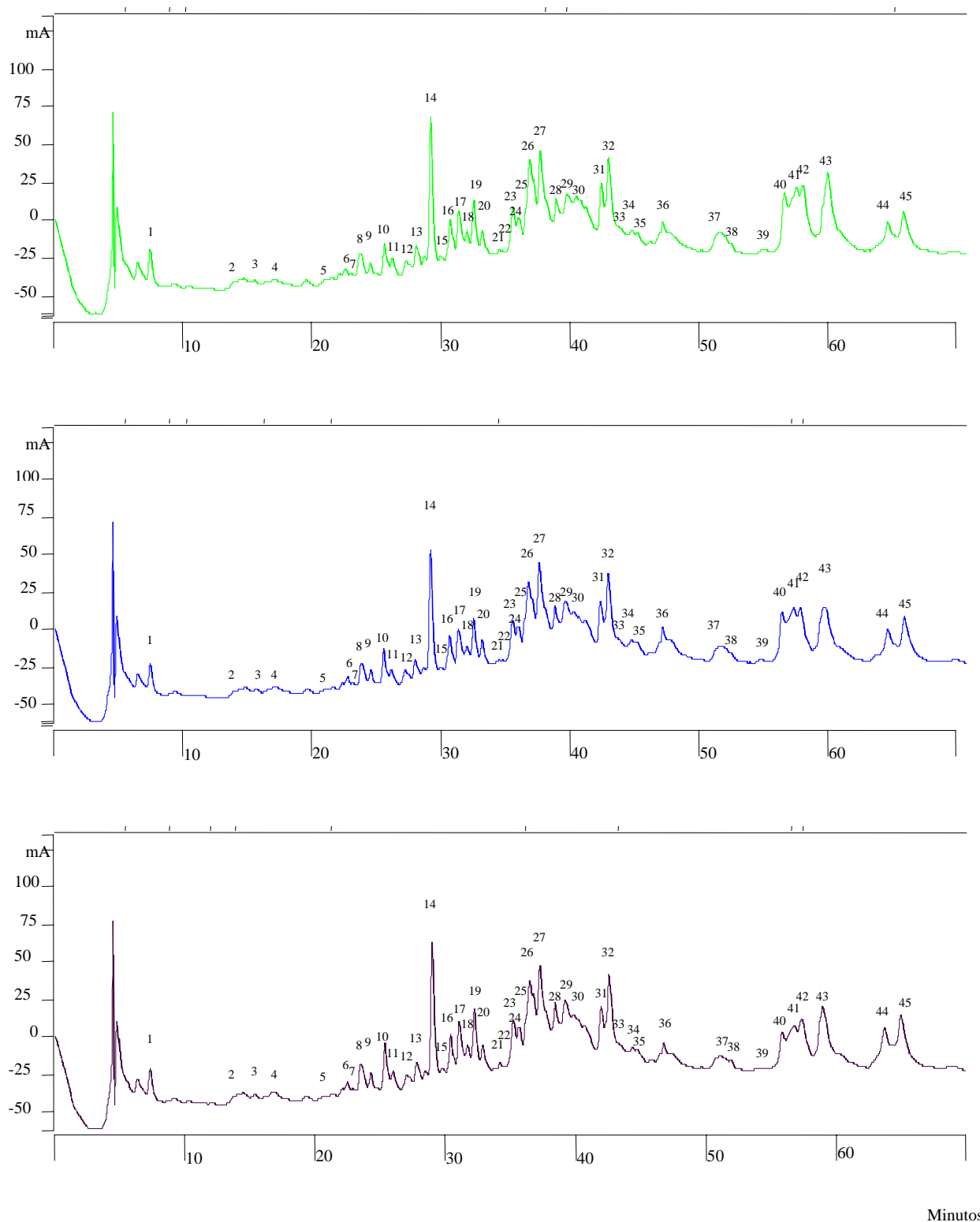
EtOH-Insoluble 90 d Lote 3

Figura 4.9: RP-HPLC cromatogramas de la fracción de NS insoluble en etanol al 70% de los tres quesos Manchegos de 90 días de maduración, elaborados con el cultivo iniciador 3 (Lote 3).

TABLA 4.4: Resultados del Análisis de Componentes Principales de la fracción **insoluble** en etanol al 70% de los extractos solubles en agua de los quesos Manchegos de **90 días** de maduración elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes.

| Componente Principal | Varianza explicada (%) | Varianza total (%) | Variables (picos) altamente correlacionadas con los CP y sus coeficientes |
|----------------------|------------------------|--------------------|--|
| 1 | 50,90 | 50,90 | 6 (0,983) 9 (0,982) 20 (0,968) 18 (0,965) 45 (0,961) 11 (0,936) 8 (0,932) 36 (-0,916) |
| 2 | 28,53 | 79,42 | 3 (0,993) 21 (0,979) 29 (0,970) 4 (0,963) 30 (0,947) 35 (0,925) |
| 3 | 12,65 | 92,07 | 43 (0,895) |

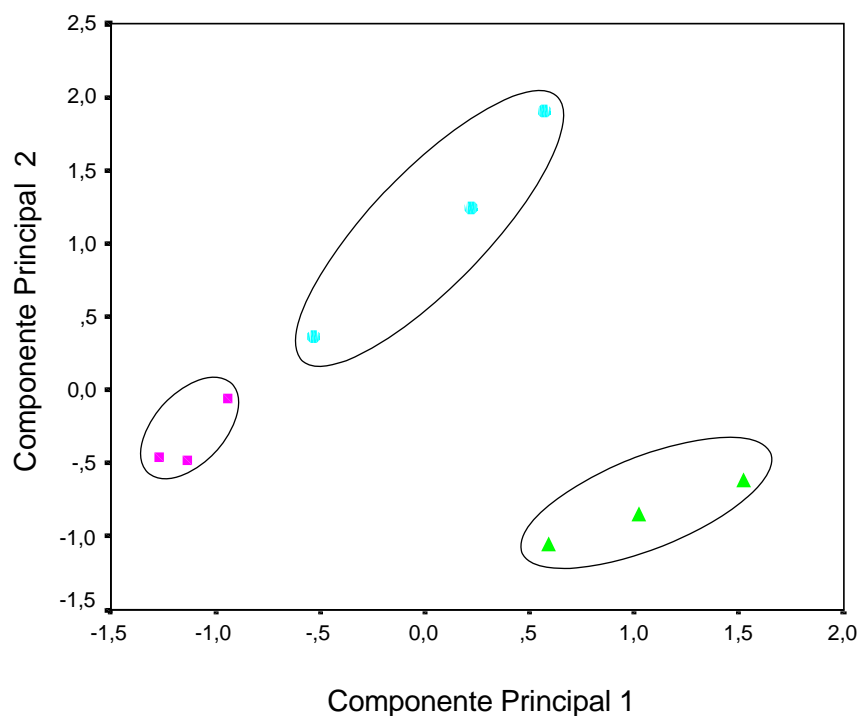


Figura 4.10: Representación en el plano definido por los dos componentes principales obtenidos del ACP del perfil de péptidos de la **fracción insoluble en etanol** de las muestras de quesos Manchegos de **90 días** elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes: lote 1 (●), lote 2 (■) y lote 3 (▲).

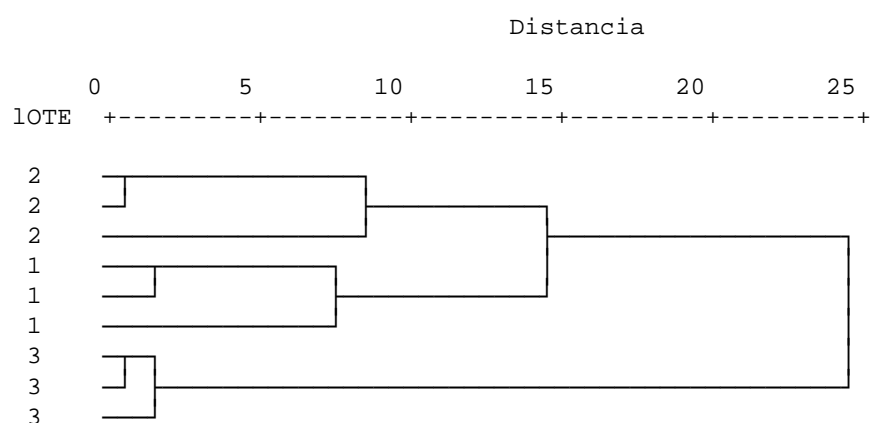


Figura 4.11: Dendrograma obtenido del Análisis de Conglomerados del perfil de péptidos de la **fracción insoluble en etanol** de las muestras de quesos Manchegos de **90 días** elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes: lotes 1, 2 y 3.

alturas de pico para los mismos péptidos. La mayoría de estos picos eluyen a tiempos de retención entre 22 y 33 min., es decir, a bajas concentraciones de acetonitrilo, por lo que podrían ser consideradas como péptidos hidrofílicos. Por último, las muestras del lote 1, situadas en la parte positiva del CP 2, tuvieron una mayor altura de pico para los péptidos 3, 21, 29, 4, 30 y 35 que los quesos de los otros dos lotes (ver Figuras 4.7, 4.8 y 4.9).

Cuando se aplicó el Análisis de Conglomerados o clusters a las mismas muestras se confirmaron los resultados obtenidos en el ACP, ya que éstas se agruparon en tres clusters o grupos, coincidiendo de nuevo con los tres inóculos distintos empleados en la fabricación de los quesos (Figura 4.11). En este caso las muestras de los lotes 1 y 2 se agruparon dentro de un grupo más general, separado de las muestras pertenecientes al lote 3. Esto podría ser debido a la similitud existente entre los dos cultivos *starter* de estos quesos, los cuales estaban formados por cepas aisladas de quesos Manchegos elaborados con leche cruda, a diferencia del cultivo mixto comercial utilizado en la fabricación de los quesos del lote 3. Estos resultados muestran de nuevo que existieron diferencias significativas en el perfil peptídico de la fracción insoluble en etanol de los quesos según el cultivo iniciador utilizado en cada caso.

Una vez comprobado que no existían diferencias entre los perfiles cromatográficos de los tres quesos pertenecientes a un mismo lote (en el caso de los quesos de 90 días) se procedió al estudio de las muestras de queso de las distintas fechas de maduración. Así, en este caso se consideraron las fechas de 15, 45, 90 y 150 días y solamente se analizó un queso dentro de cada lote.

En las Figuras 4.12, 4.13, 4.14 y 4.15 se muestran los cromatogramas de la fracción insoluble en etanol de las muestras de queso de 15, 45, 90 y 150 días de maduración, respectivamente.

En estas figuras se observan a simple vista claras diferencias entre los perfiles de los tres lotes de quesos, para cada uno de los distintos tiempos de maduración estudiados. Estas diferencias aparecen fundamentalmente en las zonas del cromatograma con tiempos de elución entre 28 y 45 minutos y a partir del minuto 55.

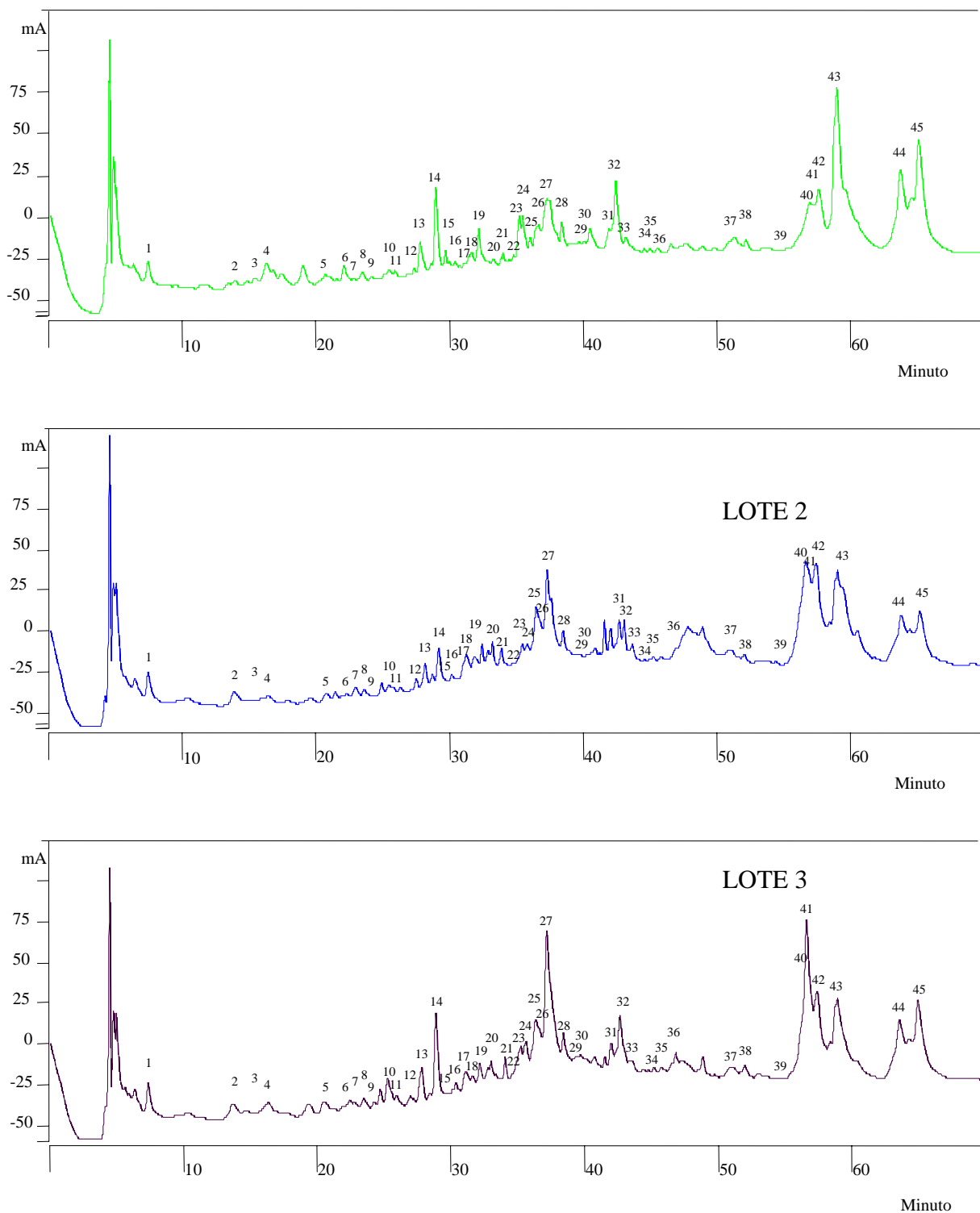
EtOH-Insoluble 15 días

Figura 4.12: RP-HPLC cromatogramas de la fracción de NS insoluble en etanol al 70% de los quesos Manchegos de 15 días de maduración, elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes (lotes 1, 2 y 3).

EtOH-Insoluble 45 días

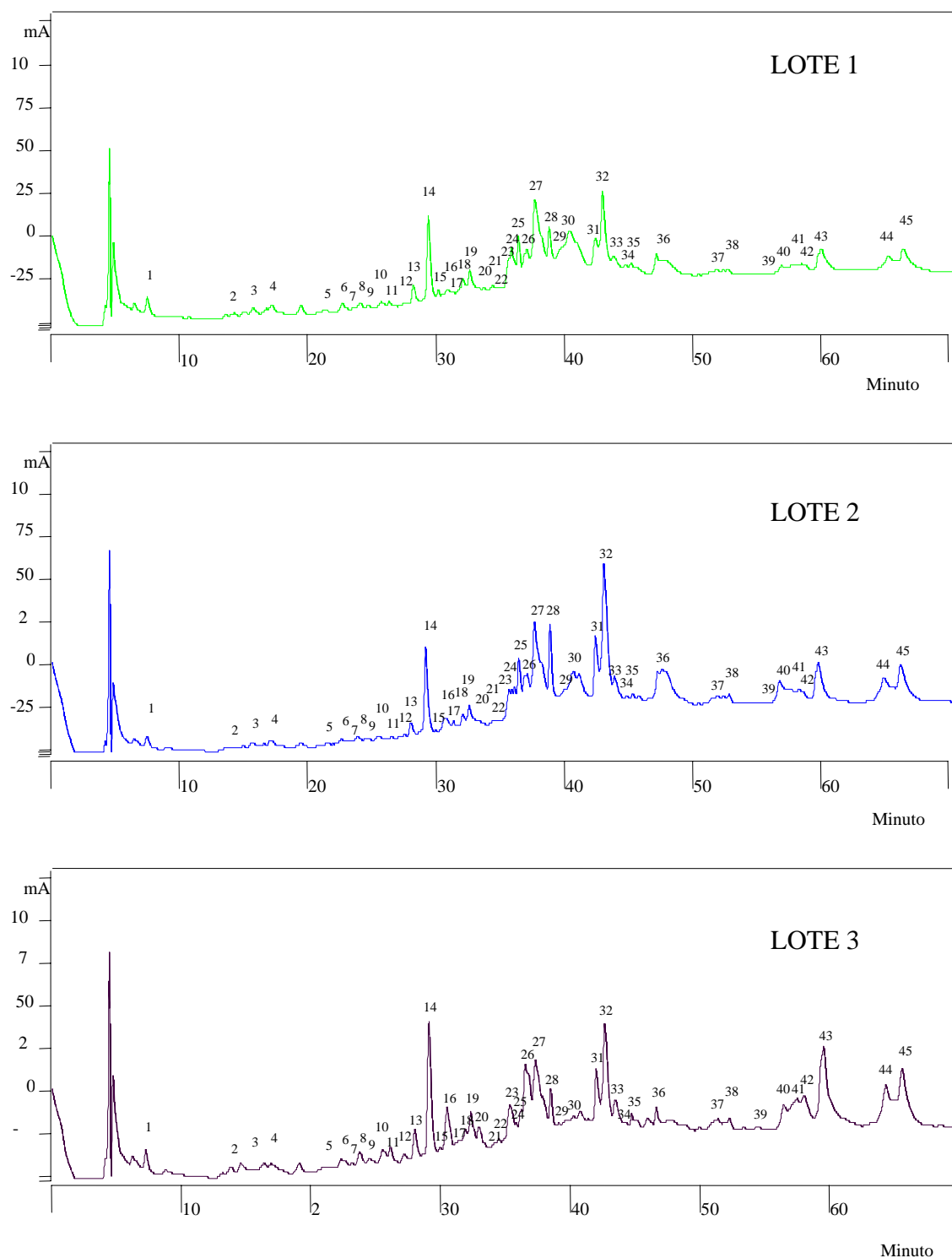


Figura 4.13: *RP-HPLC cromatogramas de la fracción de NS insoluble en etanol al 70% de los quesos Manchegos de 45 días de maduración, elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes (lotes 1, 2 y 3).*

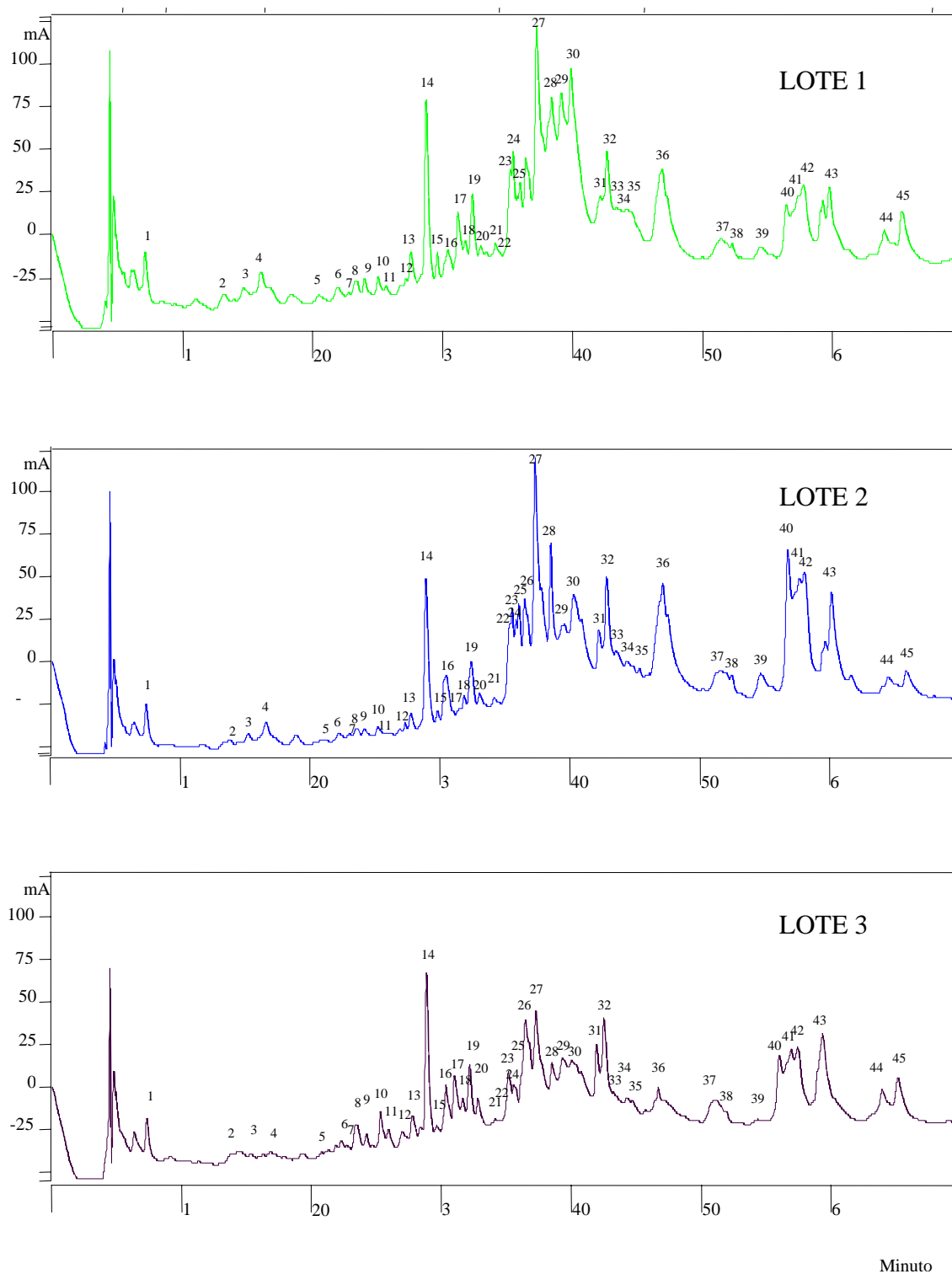
EtOH-Insoluble 90 días

Figura 4.14: RP-HPLC cromatogramas de la fracción de NS insoluble en etanol al 70% de los quesos Manchegos de 90 días de maduración, elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes (lotes 1, 2 y 3).

EtOH-Insoluble 150 días

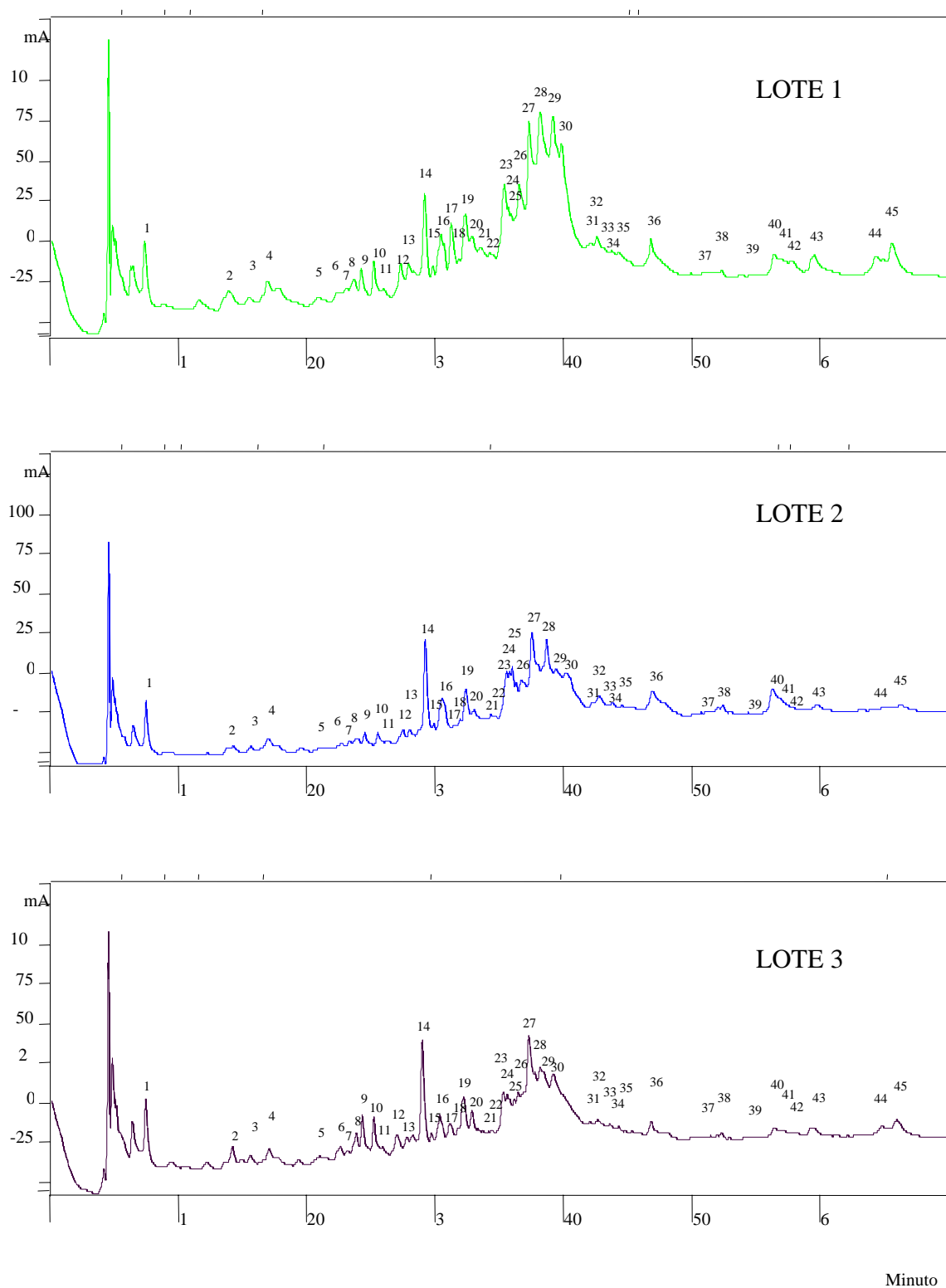


Figura 4.15: RP-HPLC cromatogramas de la fracción de NS insoluble en etanol al 70% de los quesos Manchegos de 150 días de maduración, elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes (lotes 1, 2 y 3).

Si se observa la evolución del perfil peptídico de la fracción insoluble en etanol con el tiempo de maduración, dentro de los quesos de un mismo lote, se puede apreciar que, en general, a los 15 días, los picos mayoritarios son los que eluyen en la región del final del cromatograma (picos número 40 al 45). A los 45 días se da un descenso acusado de estos picos y un ligero incremento de los picos 14 al 32 (región central del cromatograma). A los 90 días de maduración, los picos de la zona central aumentan de forma muy notable, sobre todo para los lotes 1 y 2, alcanzando en esta fecha los máximos valores de todo el período de maduración estudiado, a la vez que se produce un ligero aumento en la altura de los picos que eluyen en la zona final del cromatograma (péptidos números 37 al 45). Por último, a los 150 días todos estos péptidos comentados anteriormente experimentan una disminución, siendo ésta más acusada para los péptidos que eluyen desde el min. 55 hasta el final del cromatograma, los cuales llegan casi a desaparecer.

Los péptidos que forman parte de esta fracción insoluble en etanol al 70% corresponden a péptidos de tamaño grande e intermedio, originados por una primera hidrólisis de las caseínas. A lo largo de la maduración los péptidos de mayor tamaño van siendo hidrolizados por los agentes proteolíticos y van originando péptidos de menor peso molecular, los cuales eluyen a tiempos de retención menores. Al final de la maduración, todos estos péptidos sufren una disminución acusada, debido a que seguramente se han transformado en péptidos de menor tamaño, los cuales aparecen probablemente en la fracción soluble en etanol 70%.

Sin embargo, y aunque se observó una evolución del perfil peptídico a lo largo de la maduración en los tres lotes de quesos elaborados, al aplicar el ACP no se obtuvo una buena separación de las muestras según su tiempo de maduración.

4.3.5.2. Fracción de nitrógeno soluble en etanol al 70%

Las Figuras 4.16, 4.17 y 4.18 muestran los cromatogramas de la fracción de nitrógeno soluble en etanol al 70% de los tres quesos Manchegos de 90 días

EtOH-Soluble 90 días Lote 1

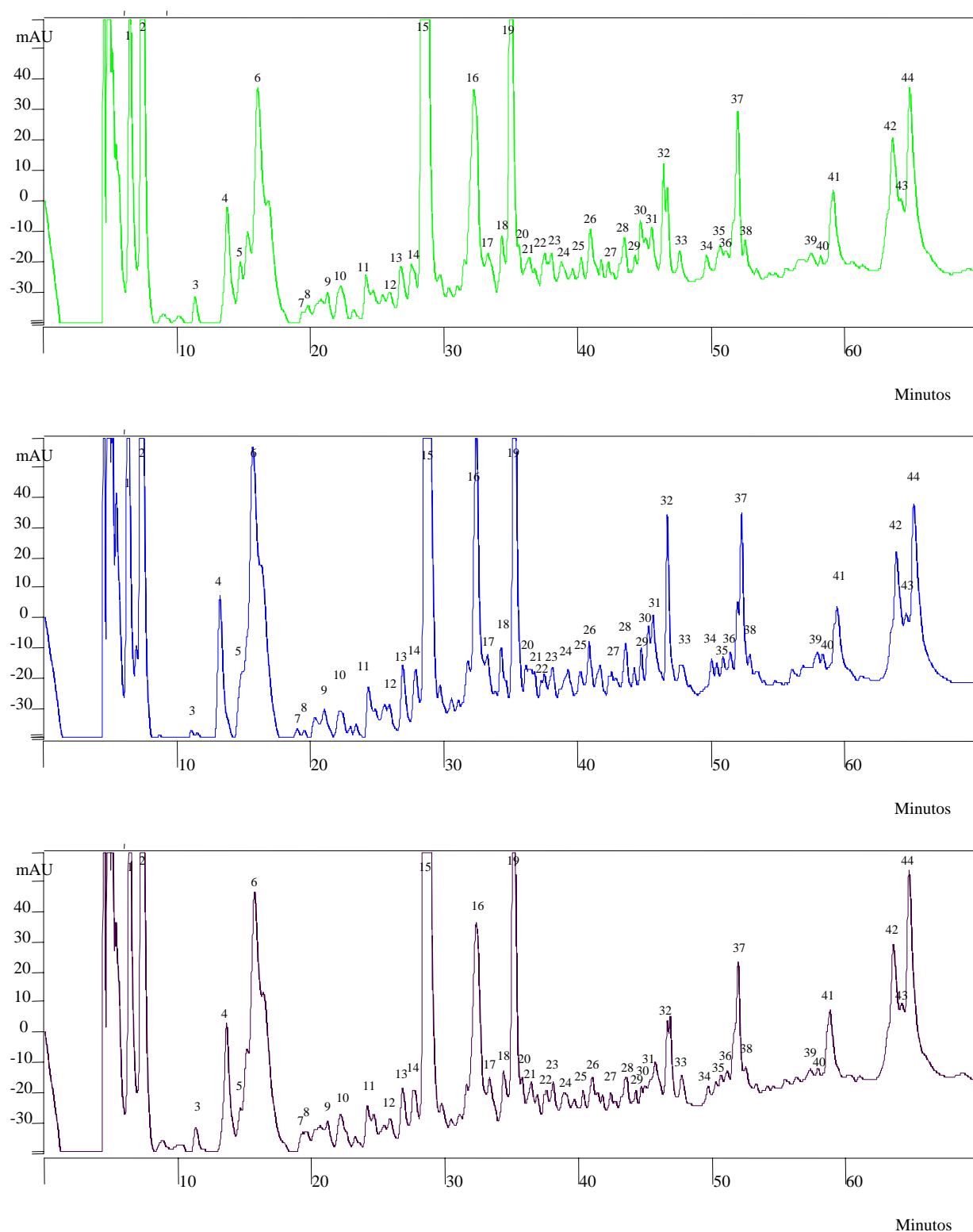


Figura 4.16: RP-HPLC cromatogramas de la fracción de NS soluble en etanol al 70% de los tres quesos Manchegos de 90 días de maduración, elaborados con el cultivo iniciador 1 (Lote 1).

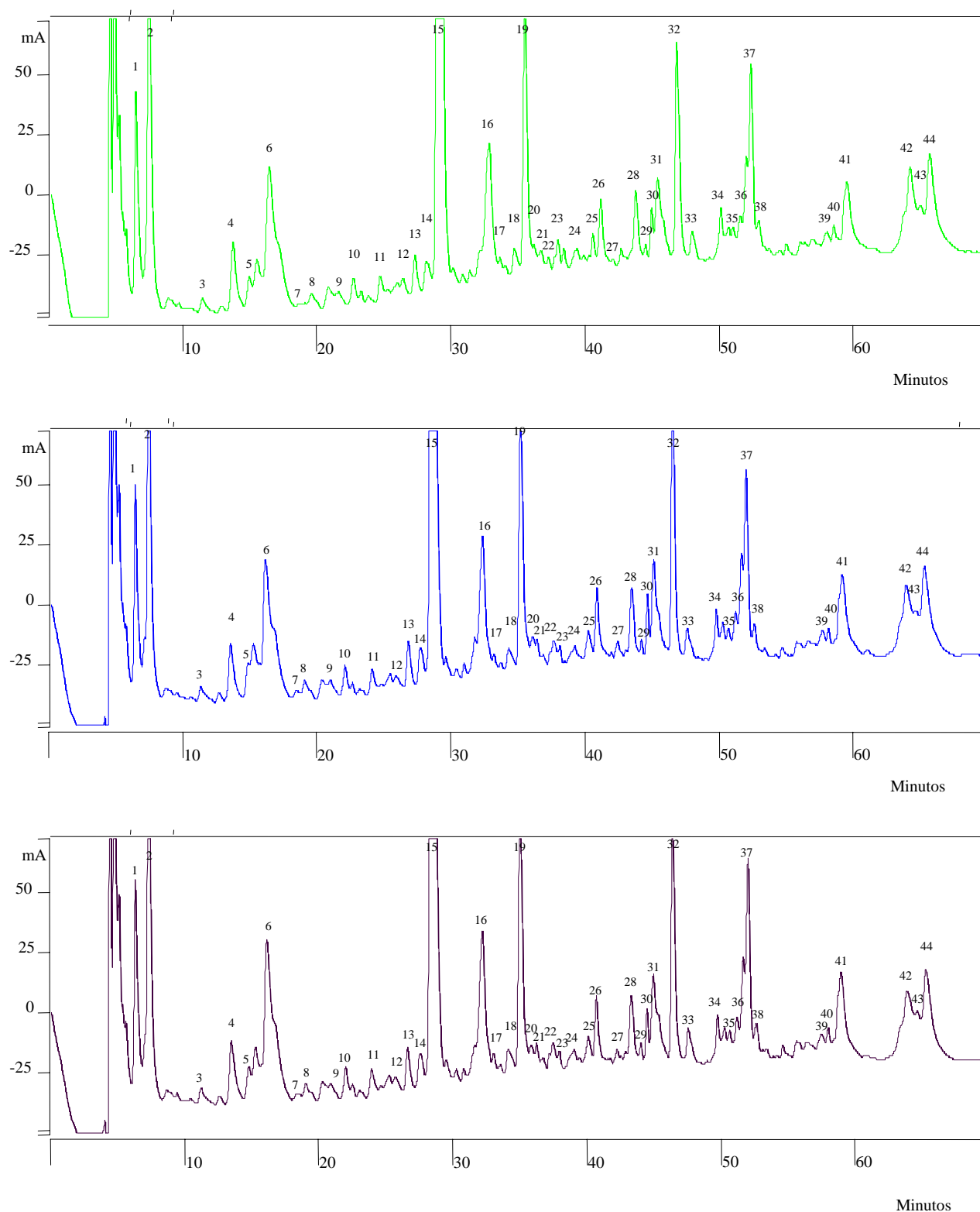
EtOH-Soluble 90 días Lote 2

Figura 4.17: *RP-HPLC* cromatogramas de la fracción de NS soluble en etanol al 70% de los tres quesos Manchegos de 90 días de maduración, elaborados con el cultivo iniciador 2 (Lote 2).

EtOH-Soluble 90 días Lote 3

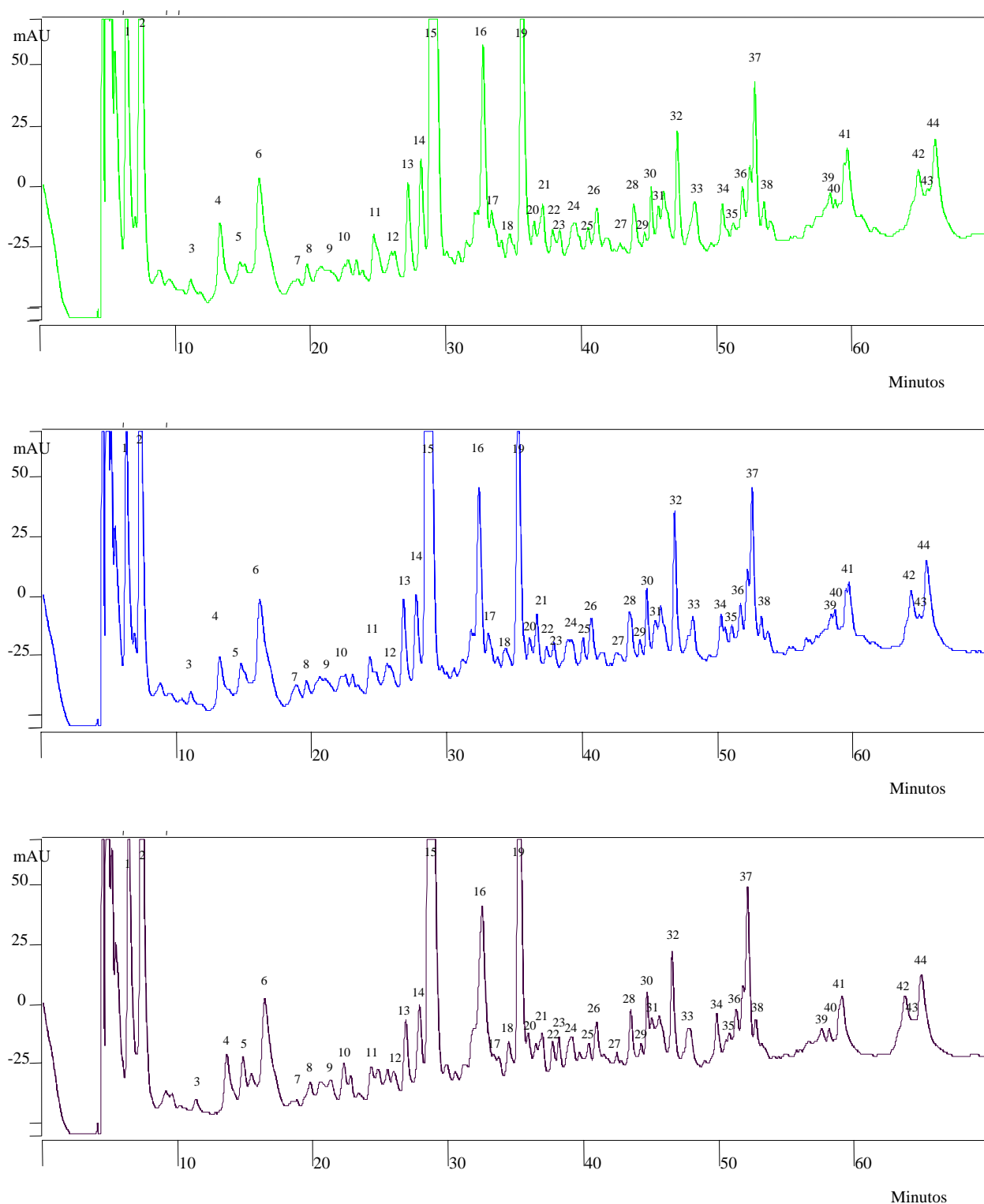


Figura 4.18: *RP-HPLC* cromatogramas de la fracción de NS soluble en etanol al 70% de los tres quesos Manchegos de 90 días de maduración, elaborados con el cultivo iniciador 3 (Lote 3).

correspondientes a cada uno de los lotes (lotes 1, 2 y 3) elaborados con distintos cultivos iniciadores. Al igual que en el caso de la fracción insoluble, los perfiles cromatográficos observados a simple vista de la fracción soluble en etanol de las muestras de los tres quesos pertenecientes al mismo lote fueron similares.

Se aplicó nuevamente el ACP a los perfiles cromatográficos de las muestras de queso de 90 días, tomando como variable la altura de pico. Los tres primeros CP explicaron el 85,1% de la varianza total (Tabla 4.5). La Figura 4.19 muestra la representación de las muestras en el plano definido por los ejes CP 1 y CP 2. De nuevo, las muestras se agruparon por lotes, es decir, según el cultivo iniciador empleado en su fabricación, de la misma forma que ocurría en el caso de la fracción insoluble en etanol.

Las muestras situadas en la parte positiva del eje CP 1 (muestras del lote 2, que contenían *Lb. plantarum* como adjunto del *starter*) presentaron unos valores más elevados para los picos 28, 25, 37, 26 y 34, mientras que las muestras localizadas en la parte negativa del mismo eje (muestras del lote 1, sin *Lb. plantarum*) tuvieron las menores cantidades de estos mismos picos. Las muestras del lote 3 (elaboradas con el cultivo comercial) presentaron cantidades intermedias de estos mismos péptidos. El CP 2 distribuyó a las muestras de acuerdo a la altura de los picos 14, 13, 21 y 39, presentando los quesos del lote 3 los mayores valores.

De todos estos péptidos más correlacionados con los componentes principales 1 y 2, se conoce la secuencia de la cadena aminoacídica de algunos de ellos. Así, el péptido número 37 pertenece a la β -caseína y los péptidos números 13, 14, 26 y 28 corresponden a distintos fragmentos de la α_{s1} -caseína (Poveda *et al.*, resultados sin publicar).

Esta distribución de las muestras se volvió a poner de manifiesto cuando se aplicó el Análisis de Conglomerados (Ver Figura 4.20), donde las muestras aparecen separadas en los mismos grupos, según el cultivo iniciador utilizado en su elaboración. En este caso, las muestras pertenecientes al lote 2 aparecen a mayor distancia de las muestras de los lotes 1 y 3, a diferencia de lo que ocurría en el caso de la fracción insoluble en etanol. Esto

TABLA 4.5: Resultados del Análisis de Componentes Principales de la fracción *soluble* en etanol al 70% de los extractos solubles en agua de los quesos Manchegos de **90 días** elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes (lotes 1, 2 y 3).

| Componente Principal | Varianza explicada (%) | Varianza total (%) | Variables (picos) altamente correlacionadas con los CP y sus coeficientes |
|----------------------|------------------------|--------------------|---|
| 1 | 44,9 | 44,9 | 28 (0,982) 25 (0,980) 37 (0,965) 26 (0,945) 34 (0,922) |
| 2 | 29,1 | 74,0 | 14 (0,994) 13 (0,986) 21 (0,961) 39 (0,935) |
| 3 | 11,1 | 85,1 | 27 (0,881) 28 (0,739) |

podría ser debido a la influencia del adjunto utilizado (*Lb plantarum*), que podría haber contribuido a una mayor producción de los péptidos 28, 25, 37, 26 y 34.

Al igual que en el caso de la fracción insoluble en etanol, una vez comprobado que no existían diferencias significativas entre los perfiles cromatográficos de la fracción soluble en etanol 70% de los tres quesos pertenecientes a un mismo lote (para los quesos de 90 días) se procedió al estudio de las muestras de queso de las fechas de maduración consideradas anteriormente (15, 45, 90 y 150 días), analizando un único queso dentro de cada lote.

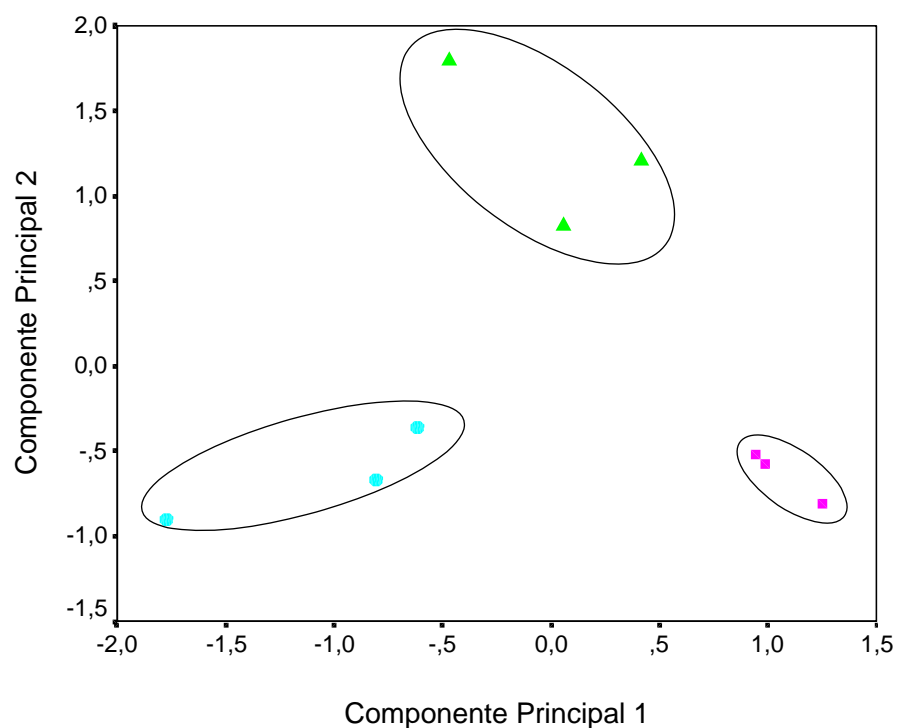


Figura 4.19: Representación en el plano definido por los dos componentes principales obtenidos del ACP del perfil de péptidos de la fracción **soluble** en etanol de las muestras de quesos Manchegos de **90 días** elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes: lote 1 (●), lote 2 (■) y lote 3 (▲).

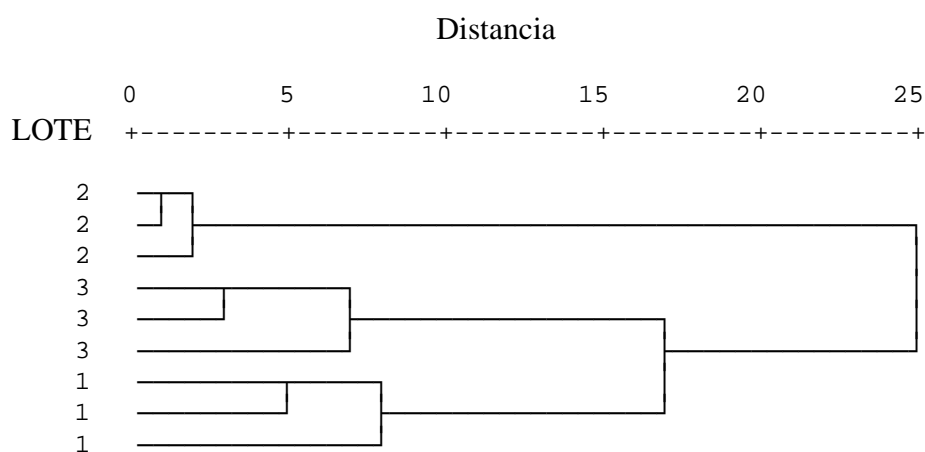


Figura 4.20: Dendrograma obtenido del Análisis de Conglomerados del perfil de péptidos de la fracción **soluble** en etanol de las muestras de quesos Manchegos de **90 días** elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes: lotes 1, 2 y 3.

En las Figuras 4.21, 4.22, 4.23 y 4.24 se muestran los cromatogramas RP-HPLC de la fracción soluble en etanol 70 % de las muestras de queso de tres lotes a los 15, 45, 90 y 150 días de maduración, respectivamente.

Se puede observar que en el caso de los tres lotes de quesos, los péptidos correspondientes a la primera zona del cromatograma (picos desde el nº 4 al 14) experimentaron un aumento progresivo con el tiempo de maduración, y los picos mayoritarios de la zona central del cromatograma (picos 15, 16, 19) aumentaron hasta los 90 días, alcanzando en este punto el valor máximo, y después disminuyeron a los 150 días de maduración.

Cabe resaltar además, que en las muestras del lote 3, los péptidos números 13 y 14 presentaron una mayor altura de pico que en los otros dos lotes, tal y como puso de manifiesto el ACP en el caso de las muestras de 90 días de maduración.

Se aplicó el ACP a estas muestras con el objetivo de ver la evolución de los péptidos de la fracción soluble en etanol con el tiempo de maduración. La Tabla 4.6 muestra los resultados obtenidos.

Los tres primeros CP explicaron el 67,67% de la varianza total. Al representar el conjunto de muestras en el plano definido por el CP 1 y el CP 2 se obtuvo la distribución que se muestra en la Figura 4.25. En ella se aprecia la existencia de 3 grupos de muestras. A la derecha, en la parte positiva del CP 1 se encuentran las muestras de 45 días más una de 90 días, las cuales poseen los mayores contenidos en los péptidos 25, 37, 32, 28 y 34, más correlacionados con el CP 1. En la parte superior izquierda de la gráfica están situadas las restantes muestras de 90 días junto con las de 150 días, las cuales poseen las mayores cantidades de los péptidos 17, 18, 20 y 2. Por último, en la parte inferior izquierda se encuentran las muestras con menor tiempo de maduración (15 días), las cuales poseen pequeñas cantidades de todos estos péptidos (los correlacionados con ambos ejes).

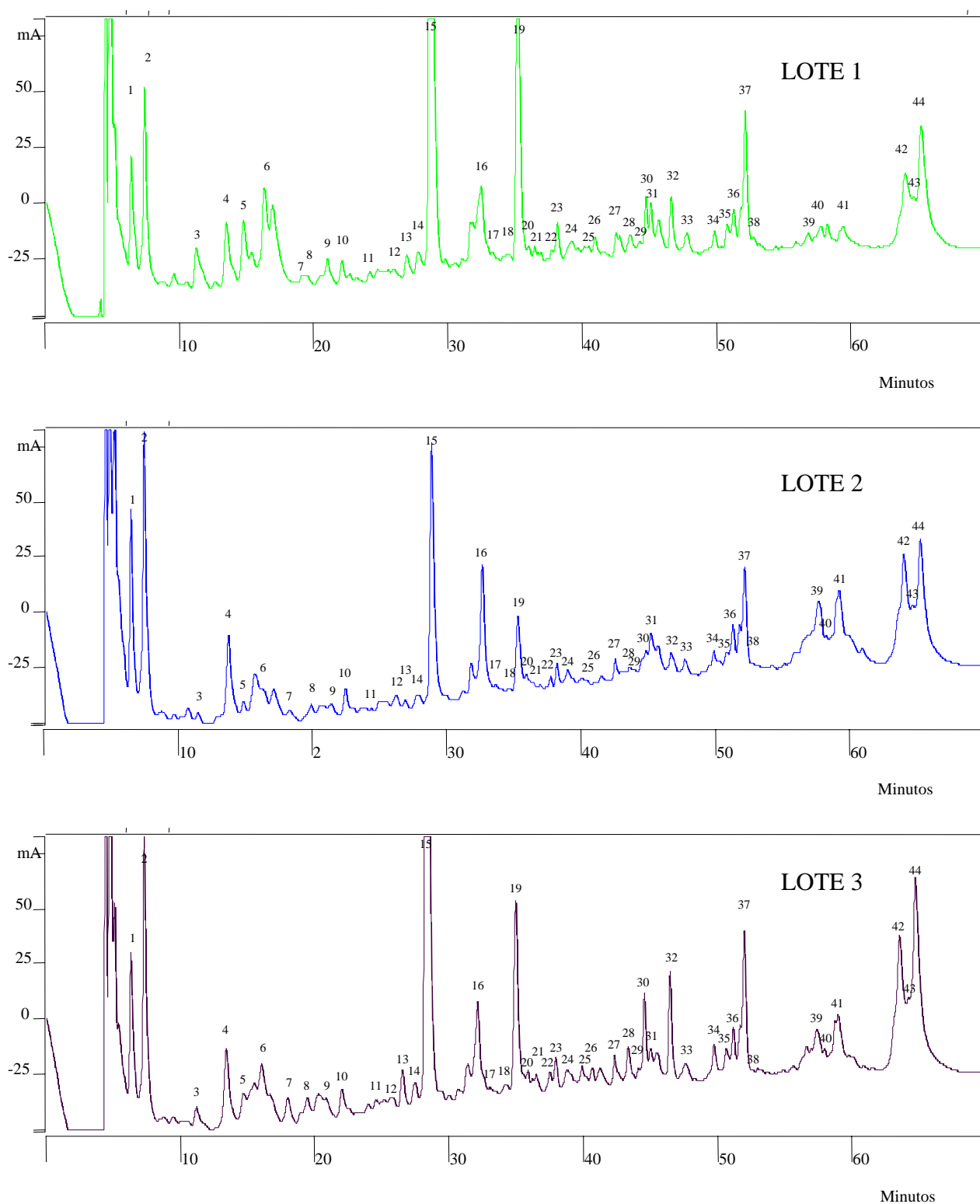
EtOH-Soluble 15 días

Figura 4.21: RP-HPLC cromatogramas de la fracción de NS soluble en etanol al 70% de los quesos Manchegos de 15 días de maduración, elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes (lotes 1, 2 y 3).

EtOH-Soluble 45 días

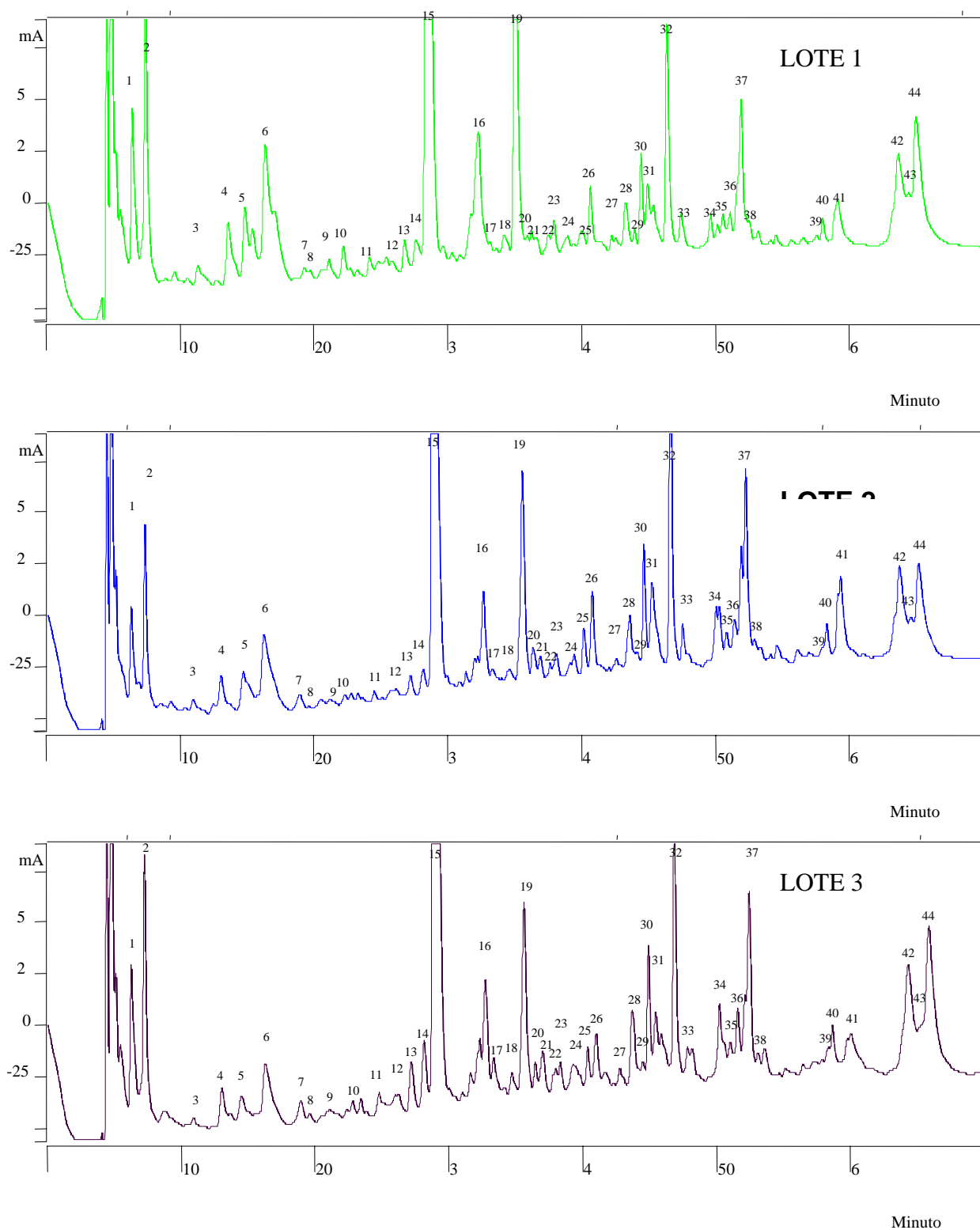


Figura 4.22: RP-HPLC cromatogramas de la fracción de NS soluble en etanol al 70% de los quesos Manchegos de 45 días de maduración, elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes (lotes 1, 2 y 3).

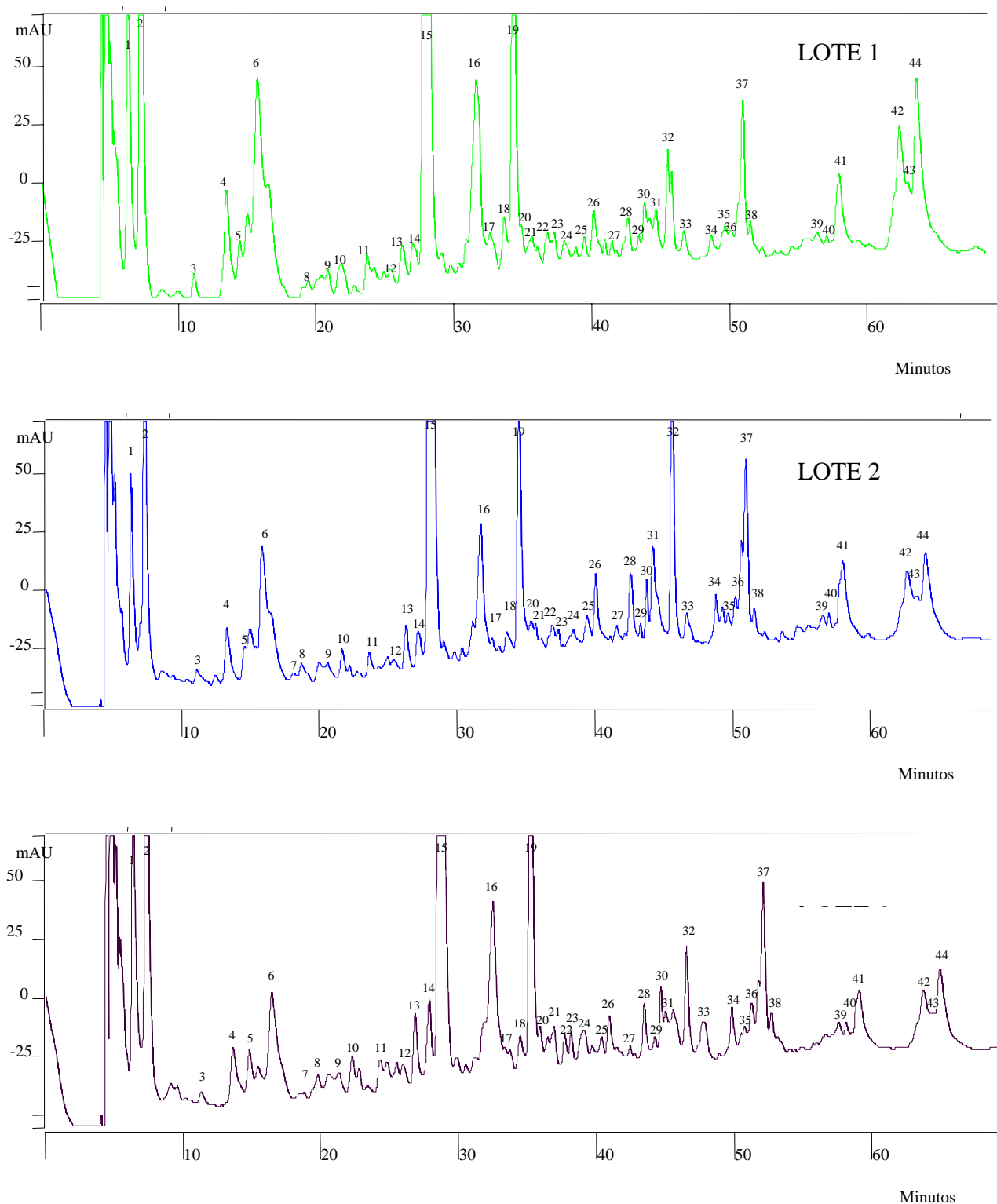
EtOH-Soluble 90 días

Figura 4.23: RP-HPLC cromatogramas de la fracción de NS soluble en etanol al 70% de los quesos Manchegos de 90 días de maduración, elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes (lotes 1, 2 y 3).

EtOH-Soluble 150 días

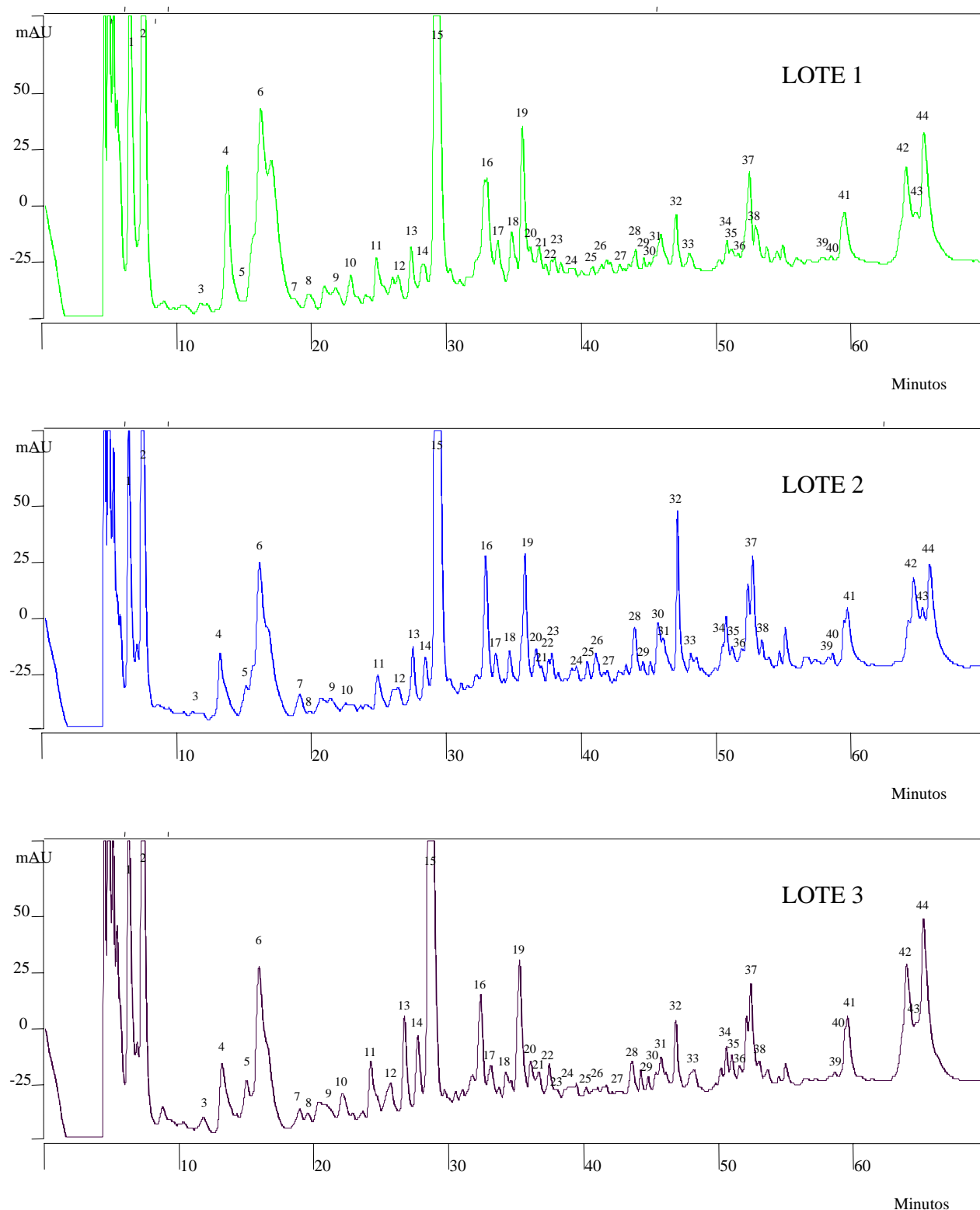


Figura 4.24: *RP-HPLC* cromatogramas de la fracción de NS soluble en etanol al 70% de los quesos Manchegos de 150 días de maduración, elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes (lotes 1, 2 y 3).

TABLA 4.6: Resultados del Análisis de Componentes Principales de la fracción **soluble** en etanol al 70% de los extractos solubles en agua de los quesos Manchegos de **15, 45, 90 y 150 días** elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes (lotes 1, 2 y 3).

| Componente Principal | Varianza explicada (%) | Varianza total (%) | Variables (picos) altamente correlacionadas con los CP y sus coeficientes |
|----------------------|------------------------|--------------------|---|
| 1 | 30,12 | 30,12 | 25 (0,956) 37 (0,935) 32 (0,934) 28 (0,907) 34 (0,902) |
| 2 | 23,84 | 53,96 | 17 (0,910) 18 (0,898) 20 (0,857) 2 (0,852) |
| 3 | 6,31 | 67,67 | 44 (0,926) 42 (0,909) 43 (0,884) |

En la Figura 4.26 se muestra el dendrograma obtenido tras aplicar el Análisis de Conglomerados a las muestras anteriores. Se puede observar la existencia de dos grupos generales: el primero contiene las muestras de 15 días, y el otro, el resto de muestras. Este segundo grupo se subdivide a su vez en otros dos: por un lado, las muestras de queso de 150 días y por otro, las de 90 y 45 días. Estos resultados concuerdan bastante con los obtenidos en el Análisis de Componentes Principales.

Cabe destacar que, en este caso la separación de las muestras de quesos por tiempos de maduración fue mejor que en el caso de la fracción insoluble en etanol.

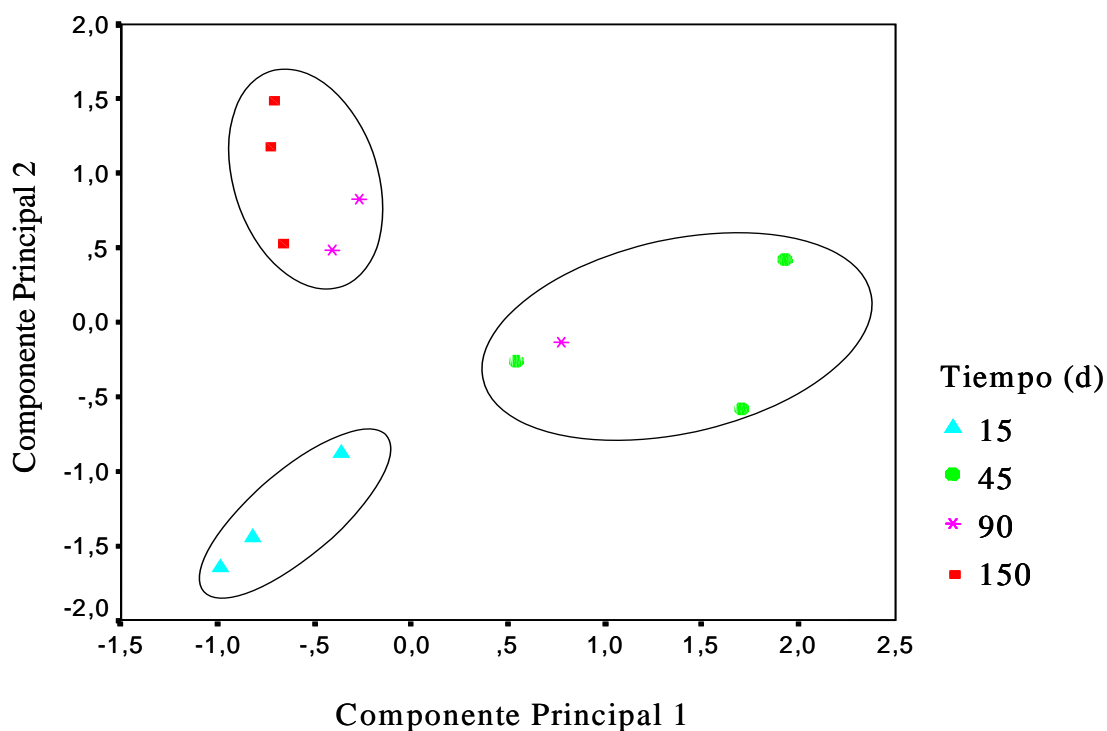


Figura 4.25: Representación en el plano definido por los dos Componentes Principales, obtenidos del ACP del perfil de péptidos de la fracción *soluble* en etanol de las muestras de quesos Manchegos de **15, 45, 90 y 150 días** elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes: lotes 1, 2 y 3.

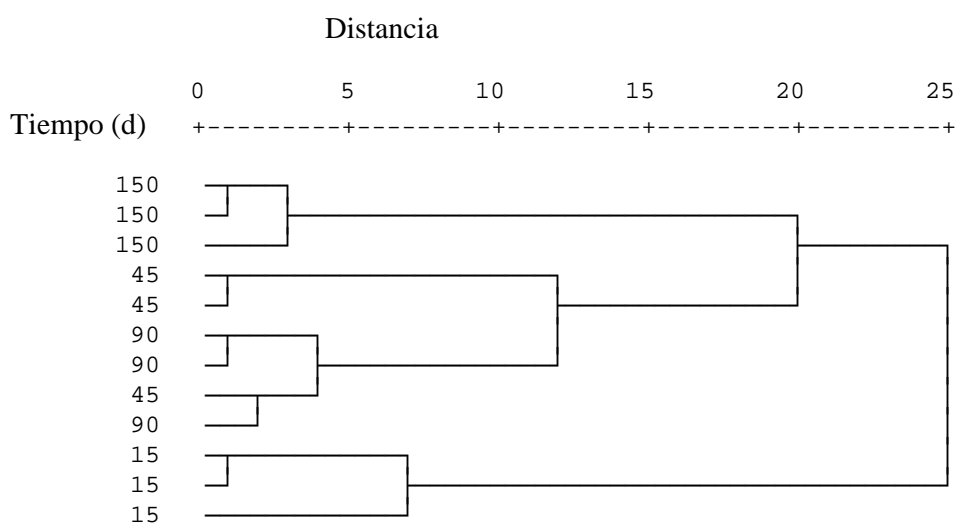


Figura 4.26: Dendrograma obtenido del Análisis de Conglomerados del perfil de péptidos de la fracción *soluble* en etanol de las muestras de quesos Manchegos de **15, 45, 90 y 150 días** elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes: lotes 1, 2 y 3.

4.3.6. Análisis de aminoácidos libres

Para completar y profundizar en el estudio de la proteólisis experimentada por las muestras de queso se realizó el análisis de los aminoácidos libres.

En la Figura 4.27 se muestra la evolución de la concentración de aminoácidos libres totales de las muestras de queso de los tres lotes estudiados con el tiempo de maduración.

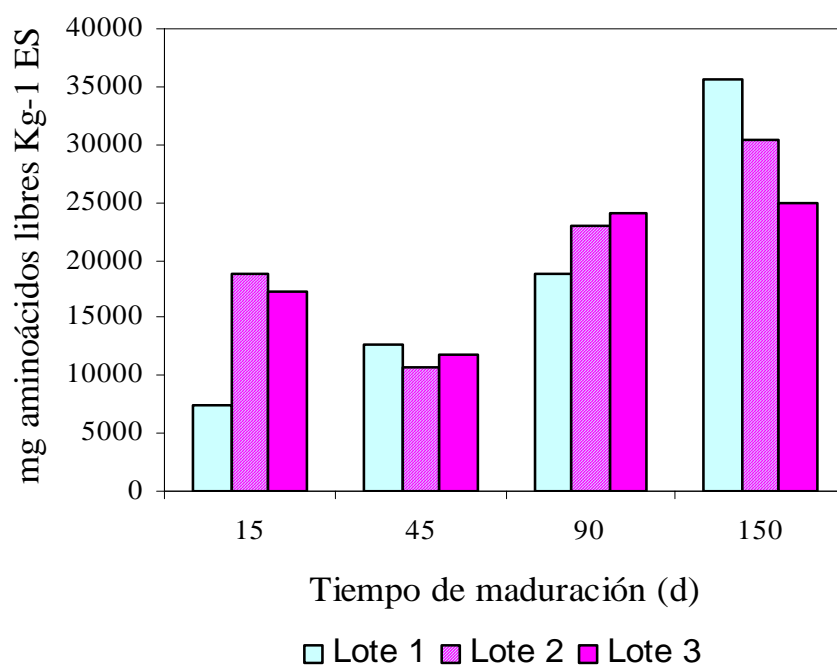


Figura 4.27: Evolución del contenido en **aminoácidos libres totales** a lo largo de la maduración de los quesos Manchegos elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes: lotes 1, 2 y 3.

Las concentraciones de aminoácidos libres totales aumentaron con la maduración en los tres lotes, si bien en los lotes 2 y 3 se dio una disminución a los 45 días y luego volvieron a aumentar de nuevo hasta el final de la maduración. Al final del período de afinado el lote de quesos que presentó una mayor concentración de aminoácidos libres totales fue el lote 1 (35.681,44 mg/Kg ES), seguido por el lote 2 (30.318,57 mg/Kg ES) y con la menor concentración, el lote 3 (24.939,26 mg/Kg ES).

En otras variedades de quesos, como el Suizo (Hintz *et al.*, 1956), Edam (Ali, 1960), Cabrales (Sala-Trepat y Burgos, 1972), Ulloa (Ordóñez y Burgos, 1977), Cheddar (Weaver y Kroger, 1978; Wallace y Fox, 1997) y Mahón (Polo *et al.*, 1985), así como también en el queso Manchego (Ordóñez y Burgos, 1980), en los que se estudió el contenido y evolución en aminoácidos libres totales durante la maduración, también se observó un aumento progresivo del contenido total de los mismos con el tiempo de afinado.

Al igual que en el caso del análisis de péptidos de las fracciones insoluble y soluble en etanol de estas muestras de quesos, el estudio de los aminoácidos se realizará en primer lugar atendiendo al estudio de las posibles diferencias entre lotes (para las muestras de 90 días de maduración) y después a las diferencias por tiempos de maduración (muestras de 15, 45, 90 y 150 días).

Se aplicó el ANOVA de un factor a las muestras de quesos Manchegos de 90 días elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes (incluyendo los tres quesos independientes dentro de cada lote), considerando como factor el lote. Los resultados se muestran en la Tabla 4.7. Hubo diferencias significativas entre lotes para los siguientes aminoácidos: aspártico, glutámico, cisteína, tirosina y arginina.

A continuación se aplicó el Análisis de Componentes Principales, a todo el conjunto de muestras de 90 días. En la Tabla 4.8 se recogen los resultados de este análisis. Los dos primeros CP explicaron el 81,7% de la varianza total, y los aminoácidos más correlacionados con cada uno fueron: alanina, serina, metionina e isoleucina (con el CP 1) y cisteína, arginina y leucina (con el CP 2).

TABLA 4.7: Valores medios¹ y desviación estándar de las concentraciones de **aminoácidos libres** de los quesos Manchegos de **90 días** de maduración elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes.

| aminoácido | lote 1 | lote 2 | lote 3 |
|------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Asp | 596,25 ^a ± 72,53 | 880,32 ^b ± 69,86 | 543,65 ^a ± 67,09 |
| Thr | 394,66 ± 63,61 | 332,81 ± 22,47 | 381,41 ± 86,07 |
| Ser | 1189,30 ± 212,05 | 939,91 ± 71,10 | 1374,80 ± 320,80 |
| Glu | 4078,14 ^a ± 645,67 | 4188,38 ^a ± 365,60 | 2384,88 ^b ± 462,56 |
| Pro | 891,38 ± 203,57 | 978,39 ± 50,71 | 809,48 ± 132,85 |
| Gly | 269,10 ± 94,30 | 217,19 ± 5,29 | 186,92 ± 61,25 |
| Ala | 538,55 ± 101,60 | 459,68 ± 31,37 | 616,29 ± 164,97 |
| Cys | 384,71 ^a ± 31,60 | 331,58 ^{a,b} ± 14,51 | 269,84 ^b ± 53,19 |
| Val | 3000,73 ± 426,48 | 2533,51 ± 210,97 | 2525,65 ± 451,70 |
| Met | 491,11 ± 95,89 | 437,12 ± 44,04 | 660,61 ± 120,37 |
| Ile | 616,54 ± 154,24 | 519,48 ± 42,39 | 632,14 ± 125,69 |
| Leu | 4252,77 ± 566,33 | 3469,04 ± 288,01 | 3093,84 ± 691,97 |
| Tyr | 1190,84 ^a ± 185,74 | 709,88 ^b ± 139,57 | 1253,76 ^a ± 210,40 |
| Phe | 2333,97 ± 364,10 | 1773,51 ± 168,57 | 1949,73 ± 475,10 |
| His | 528,89 ± 65,56 | 735,99 ± 246,09 | 469,26 ± 166,91 |
| Lys | 1127,08 ± 153,26 | 1410,38 ± 120,60 | 1055,38 ± 249,12 |
| NH3 | 576,05 ^a ± 61,76 | 779,64 ^a ± 136,34 | 1088,74 ^b ± 173,32 |
| Arg | 52,30 ^a ± 23,48 | 172,02 ^a ± 55,43 | 384,44 ^b ± 151,80 |

¹: Cada valor corresponde a la media del análisis de tres quesos independientes.

^{a, b}: Medias en la misma **fila** con superíndices distintos son significativamente diferentes entre sí según el test de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

TABLA 4.8: Resultados del Análisis de Componentes Principales de las concentraciones de **aminoácidos libres individuales** de los quesos Manchegos de **90 días** elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes.

| Componente Principal | Varianza explicada (%) | Varianza total (%) | Variables (aá) altamente correlacionadas con los CP y sus coeficientes |
|----------------------|------------------------|--------------------|--|
| 1 | 51,26 | 51,26 | ala (0,967) ser (0,965) met (0,954) ile (0,931) |
| 2 | 30,41 | 81,67 | cys (0,976) arg (-0,949) leu (0,925) |
| 3 | 11,68 | 93,35 | asp (0,930) lys (0,895) |

La Figura 4.28 muestra la representación de las muestras en el plano definido por el CP 1 y el CP 2. Se puede observar que las muestras se separaron en tres grupos coincidiendo con los tres lotes de quesos, elaborados cada uno con un cultivo iniciador diferente. Las muestras del lote 2 constituyeron un grupo más homogéneo, con concentraciones intermedias de los aminoácidos más correlacionados con ambos ejes. Las muestras pertenecientes al lote 1, situadas en la parte positiva del CP 2, poseen altas concentraciones de cisteína y leucina y bajas de arginina. Por último las muestras del lote 3, situadas en la parte negativa del CP 2 poseen las concentraciones más bajas de cisteína y leucina y las más elevadas de arginina.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ANOVA, si bien cabe destacar que existen pequeñas diferencias al aplicar un método estadístico u otro.

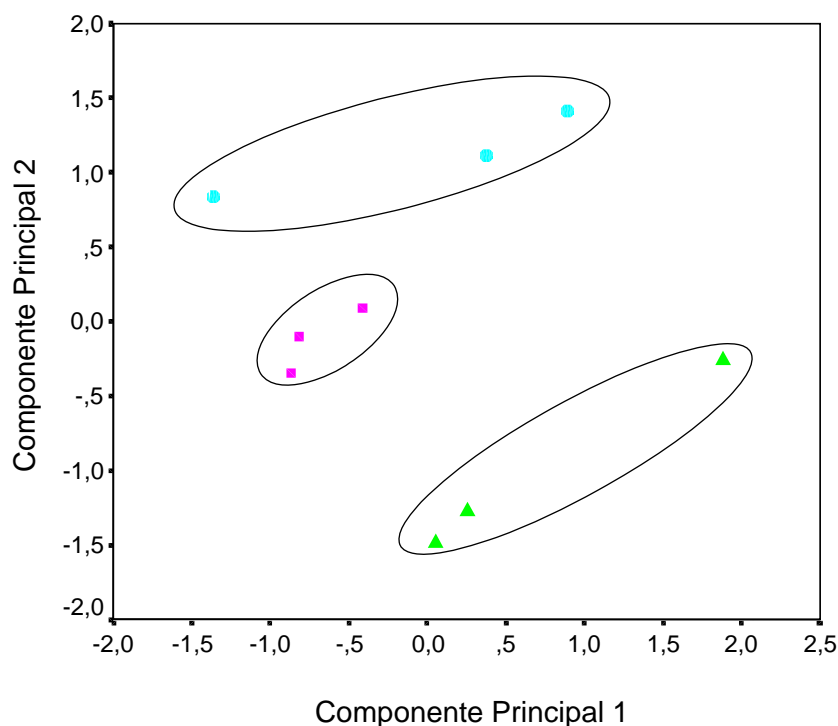


Figura 4.28: Representación en el plano definido por los dos Componentes Principales obtenidos del ACP de las concentraciones de **aminoácidos libres individuales** de las muestras de quesos Manchegos de **90 días** elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes: lote 1 (●), lote 2 (■) y lote 3 (▲).

En la Tabla 4.9 se presentan los resultados en mg aminoácidos libres individuales/Kg ES de queso de las muestras de quesos Manchegos elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes, analizados a los 15, 45, 90 y 150 días de maduración y en las Figuras 4.29 y 4.30 se representa la evolución de estas concentraciones de aminoácidos libres individuales frente al tiempo de maduración. Los aminoácidos mayoritarios a lo largo del período de maduración estudiado fueron, en general para todas las fechas consideradas, glutámico, valina, leucina, fenilalanina y lisina, para los tres lotes de quesos.

Tabla 4.9: Concentración de aminoácidos libres (mg/Kg ES) de las muestras de queso Manchegos elaborados con los tres cultivos iniciadores (lotes 1, 2 y 3)

| Aminoácido (µg/g ES) | 15 días | | | 45 días | | | 90 días | | | 150 días | | |
|-------------------------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 | Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 | Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 | Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 |
| Asp | 374,31 | 1273,88 | 1084,62 | 458,37 | 507,93 | 400,07 | 518,79 | 960,85 | 620,51 | 794,93 | 1052,32 | 721,24 |
| Thr | 153,47 | 580,66 | 459,46 | 198,79 | 81,33 | 210,50 | 325,10 | 355,58 | 480,67 | 468,39 | 402,98 | 402,10 |
| Ser | 456,41 | 1053,33 | 1188,13 | 665,59 | 345,95 | 780,06 | 967,79 | 1021,97 | 1743,59 | 1681,44 | 1440,06 | 1647,73 |
| Glu | 1306,74 | 3662,16 | 2551,52 | 1931,16 | 2063,65 | 1015,50 | 3346,17 | 4610,48 | 2917,97 | 7362,65 | 6733,77 | 2855,43 |
| Pro | 441,41 | 779,41 | 696,55 | 475,88 | 506,83 | 619,79 | 714,39 | 1022,78 | 962,70 | 1746,22 | 1516,92 | 1501,22 |
| Gly | 62,84 | 134,10 | 168,92 | 64,17 | 74,67 | 84,23 | 176,68 | 222,72 | 257,64 | 404,72 | 316,29 | 340,93 |
| Ala | 259,54 | 713,02 | 691,68 | 281,11 | 209,76 | 420,57 | 425,66 | 495,35 | 806,24 | 899,15 | 742,19 | 786,82 |
| Cys | 154,67 | 225,27 | 249,05 | 308,42 | 189,87 | 255,09 | 354,40 | 347,27 | 329,25 | 390,07 | 318,37 | 285,06 |
| Val | 805,31 | 1382,53 | 1656,70 | 1896,86 | 1314,86 | 1447,86 | 2516,86 | 2776,94 | 3044,27 | 3948,40 | 3276,87 | 2898,73 |
| Met | 164,64 | 590,52 | 559,10 | 202,96 | 188,36 | 302,42 | 380,39 | 487,78 | 792,40 | 846,45 | 776,05 | 665,38 |
| Ile | 244,11 | 855,66 | 654,60 | 226,42 | 187,93 | 295,93 | 439,50 | 568,43 | 773,67 | 1139,38 | 938,21 | 830,81 |
| Leu | 1127,61 | 2039,53 | 2096,66 | 2307,45 | 1584,80 | 1542,94 | 3598,91 | 3801,58 | 3876,92 | 6592,30 | 4709,73 | 4329,07 |
| Tyr | 443,20 | 714,85 | 689,75 | 777,07 | 301,37 | 789,88 | 976,47 | 826,58 | 1482,80 | 1664,08 | 662,56 | 1424,89 |
| Phe | 604,17 | 1030,62 | 1348,95 | 1338,98 | 699,06 | 1040,79 | 1913,56 | 1967,37 | 2491,69 | 3107,71 | 2174,01 | 2243,97 |
| His | 127,04 | 588,78 | 461,58 | 210,03 | 292,01 | 354,28 | 598,96 | 1013,20 | 568,23 | 1354,00 | 1025,31 | 591,77 |
| Lys | 371,07 | 1604,82 | 1501,40 | 925,34 | 656,93 | 583,83 | 950,93 | 1549,55 | 1342,28 | 2215,02 | 2495,98 | 1956,88 |
| NH3 | 211,62 | 791,34 | 482,56 | 424,72 | 853,96 | 1657,93 | 522,54 | 697,50 | 1282,85 | 1066,55 | 1221,47 | 1070,62 |
| Arg | 208,38 | 672,16 | 623,69 | 0,00 | 557,57 | 0,00 | 39,90 | 134,42 | 212,05 | 0,00 | 515,49 | 386,60 |
| TOTAL | 7516,54 | 18692,66 | 17164,91 | 12693,32 | 10616,83 | 11801,68 | 18767,01 | 22860,34 | 23985,75 | 35681,44 | 30318,57 | 24939,26 |

Estos aminoácidos fueron también los predominantes durante la maduración de otras variedades diferentes de quesos, como en los quesos Gruyère y Sbrinz (Lavanchy y Sieber, 1993).

En queso Cheddar los aminoácidos libres más abundantes durante la maduración fueron glutámico, leucina, valina, isoleucina, lisina y fenilalanina (Law *et al.*, 1976; Dilanian, 1980; Hickey *et al.*, 1983; Puchades *et al.*, 1989; Wilkinson, 1993).

También, Barcina *et al.*, (1995) observaron que los aminoácidos libres mayoritarios en queso Idiazábal (elaborado con leche de oveja) a lo largo de la maduración fueron glutámico (con un valor de 275,9 mg/100 g ES a los 180 días de maduración), leucina (125,4 mg/100 g ES), valina (81,3 mg/100 g ES), fenilalanina (78,5 mg/100 g ES) y lisina (73,9 mg/100 g ES). Mendía *et al.* (2000) en un estudio realizado también en quesos Idiazábal elaborados con leche cruda, leche cruda adicionada con cultivo *starter* y con leche pasteurizada con cultivo *starter*, encontraron como aminoácidos mayoritarios en los tres casos glutámico, leucina y valina.

Ordóñez y Burgos (1980) encontraron que los aminoácidos libres mayoritarios en queso Manchego conservado en aceite de oliva fueron lisina, leucina, valina, fenilalanina e isoleucina. En estos quesos el ácido glutámico no fue el aminoácido mayoritario como ocurre en la mayoría de las variedades.

En las muestras de queso Manchego del presente estudio elaboradas con los tres cultivos iniciadores diferentes se observó, como era de esperar, una tendencia de casi todos los aminoácidos a aumentar con el tiempo de maduración, ya que a medida que transcurre la proteólisis éstos van siendo liberados por los agentes proteolíticos, fundamentalmente por los enzimas microbianos, a través de diferentes procesos bioquímicos que tienen lugar durante la maduración del queso. La proteólisis de la α_{s1} -caseína, la cual posee un elevado contenido en los aminoácidos leucina, fenilalanina y valina, se da durante los primeros días de la maduración, y predomina sobre la proteólisis de la β -caseína (Frau *et al.*, 1997). El elevado contenido en ácido glutámico de las muestras de queso podría ser debido a la contribución de diferentes factores, como el

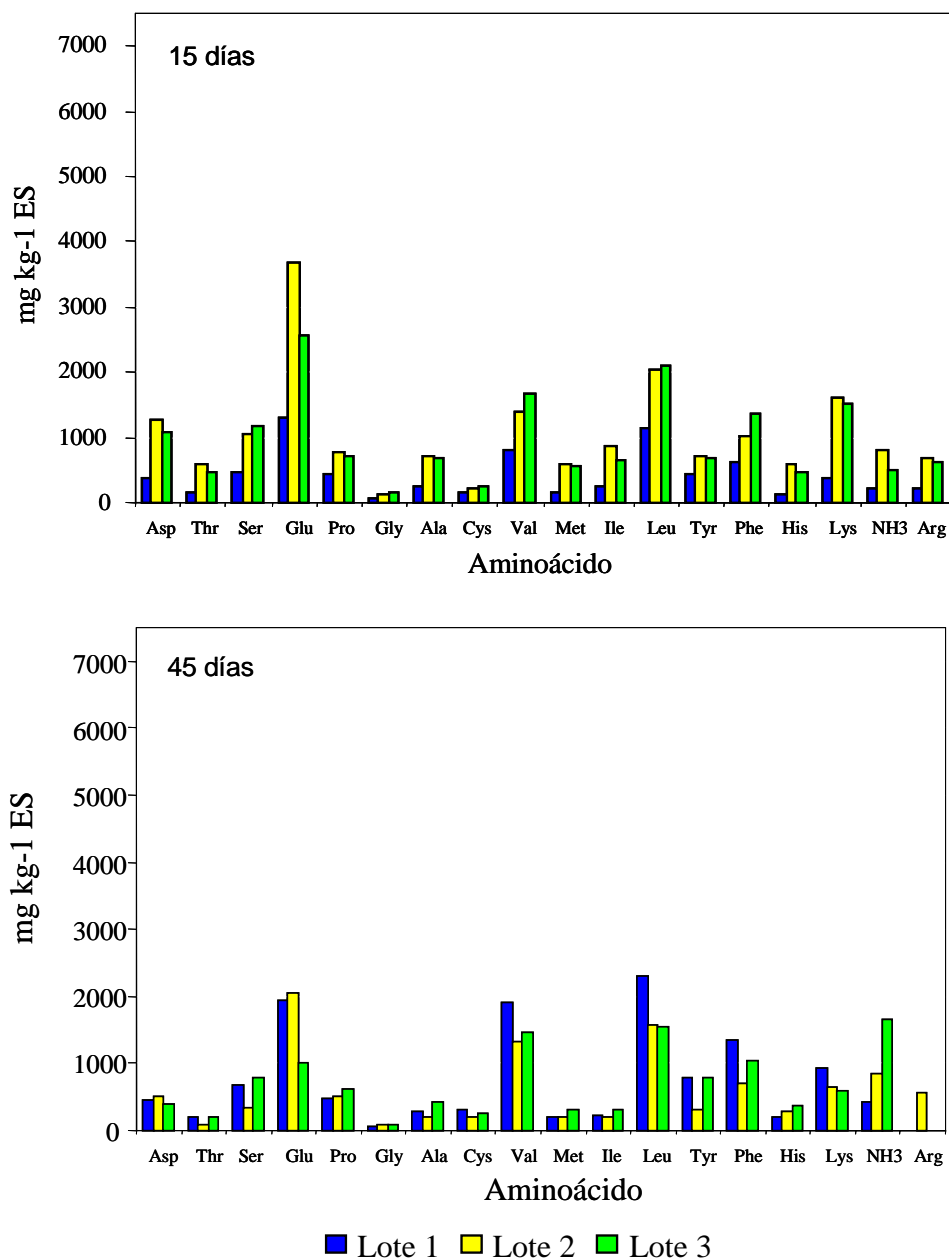


Figura 4.29: Evolución del contenido en *aminoácidos libres individuales* (mg/Kg ES de queso) a los **15 y 45 días** de maduración de las muestras de los quesos Manchegos elaborados con cultivos iniciadores diferentes: lotes 1, 2 y 3.

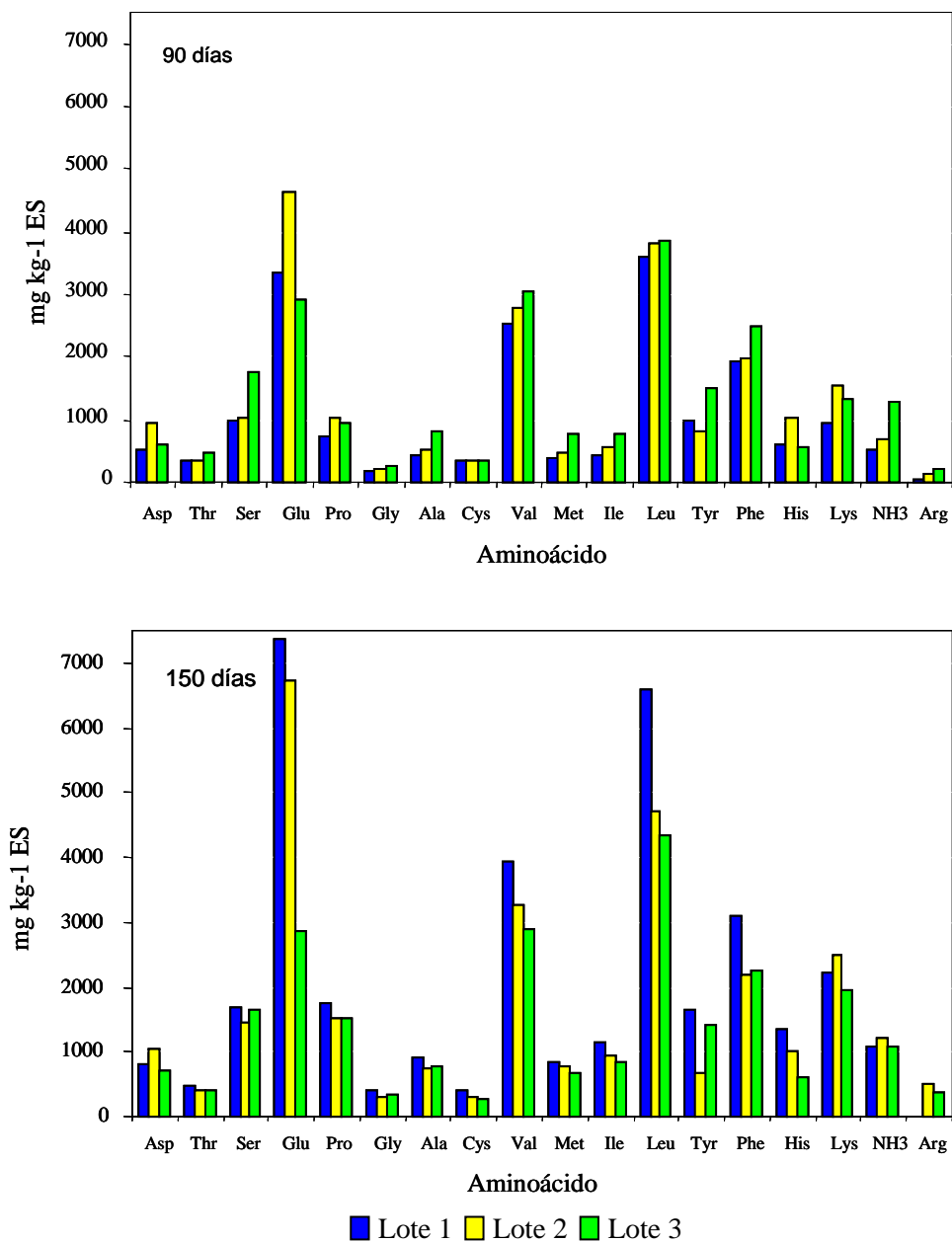


Figura 4.30: Evolución del contenido en *aminoácidos libres individuales* (mg/Kg ES de queso) a los **90 y 150 días** de maduración de las muestras de los quesos Manchegos elaborados con cultivos iniciadores diferentes: lotes 1, 2 y 3.

elevado porcentaje de glutámico en la caseína y la formación de glutámico a partir de glutamina, valina, leucina e isoleucina, debido a las actividades glutaminasa y transaminasa. Aunque la prolina es uno de los aminoácidos mayoritarios en la β -caseína, las concentraciones de prolina libre no fueron muy elevadas en las muestras de quesos estudiadas, lo cual es indicativo del bajo grado de hidrólisis experimentado por la β -caseína.

Se aplicó el ACP a los resultados de los aminoácidos libres de las muestras de queso de 15, 45, 90 y 150 días, para los tres lotes de quesos elaborados. Este análisis generó dos CP, los cuales explicaron el 88,8% de la varianza total (Tabla 4.10). Los aminoácidos más correlacionados con cada eje fueron fenilalanina, valina, leucina, cisteína y tirosina, con el CP 1, y ácido aspártico y arginina con el CP 2. Al representar el conjunto de muestras en el plano definido por estos dos CP se obtuvo la Figura 4.31. Se observa la existencia de cuatro grupos, los cuales coinciden con los cuatro tiempos de maduración estudiados, si bien una de las muestras de 15 días aparece agrupada con las de 45 días. Las muestras situadas en la parte negativa del CP 1 (muestras de 15 y 45 días) poseen menores contenidos en los aminoácidos phe, val, leu, cys y tyr que las muestras situadas en la parte positiva del mismo (muestras de 90 y 150 días de maduración). Teniendo en cuenta que este CP explicó un elevado porcentaje de la varianza total (75,6%), se puede decir que el contenido en estos aminoácidos libres separó al conjunto de las muestras en dos grupos generales: muestras de corto tiempo de maduración y muestras con un elevado tiempo de maduración. Cuando se aplicó a estas muestras el Análisis de Conglomerados se obtuvieron los mismos grupos: por un lado las muestras de 15 y 45 días, y por otro las de 90 y 150 días (Figura 4.32).

Finalmente se aplicó el análisis de correlación de las concentraciones de aminoácidos libres con el tiempo de maduración. En la Tabla 4.11 se muestran los coeficientes de correlación de los aminoácidos libres con el tiempo de maduración. Las concentraciones de aminoácidos libres individuales presentaron una correlación con el tiempo superior a 0,9 en los quesos del lote 1 para todos los aminoácidos excepto para la arginina. En el caso de los quesos del lote 2, solamente se obtuvieron coeficientes de correlación superiores a 0,9 para los aminoácidos prolina, glicina, valina y leucina, y en

TABLA 4.10: Resultados del Análisis de Componentes Principales de las concentraciones de **aminoácidos libres individuales** de los quesos Manchegos de **15, 45, 90 y 150 días** de maduración elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes.

| Componente Principal | Varianza explicada (%) | Varianza total (%) | Variables (aá) altamente correlacionadas con los CP y sus coeficientes |
|----------------------|------------------------|--------------------|---|
| 1 | 75,62 | 75,62 | phe (0,980) val (0,961) leu (0,957) cys (0,934) tyr (0,902) |
| 2 | 13,18 | 88,80 | asp (0,894) arg (0,849) |

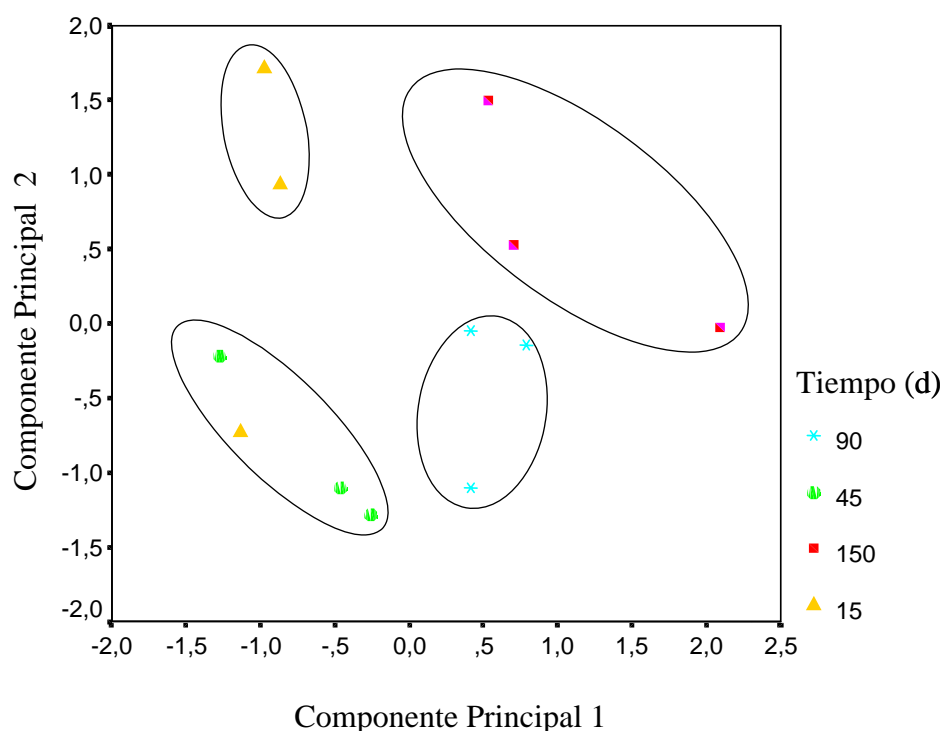


Figura 4.31: Representación en el plano definido por los dos Componentes Principales obtenidos del ACP del contenido en **aminoácidos libres**, de las muestras de quesos Manchegos de **15, 45, 90 y 150 días** elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes

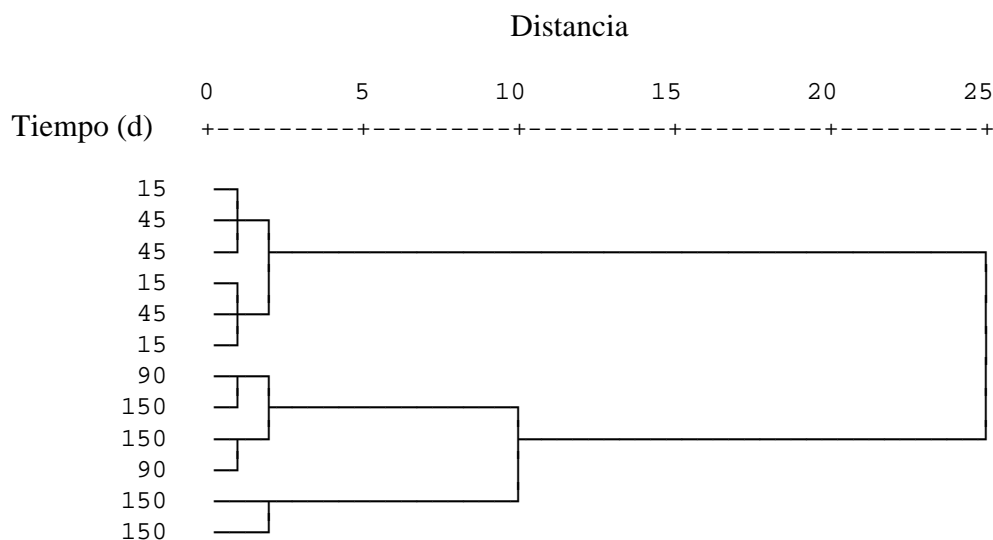


Figura 4.32: Dendrograma obtenido del Análisis de Conglomerados del contenido en aminoácidos libres de las muestras de quesos Manchegos de 15, 45, 90 y 150 días elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes: lotes 1, 2 y 3.

las muestras del lote 3 para prolina, glicina, leucina y tirosina. Los menores coeficientes de correlación se obtuvieron para la arginina. Esto último está de acuerdo con lo encontrado por otros autores en otros tipos de quesos, como el Appenzeller, Emmental, Gruyère, Raclette, Sbrinz y Tilsiter (Bütikofer y Fuchs, 1997) y es importante que este aminoácido no aumente con la maduración, ya que es responsable de sabores amargos (Kirimura *et al.*, 1969; Lemieux y Simard, 1992).

Otros autores obtuvieron también buenas correlaciones de los aminoácidos libres con el tiempo de maduración. Así, en queso Idiazábal, los coeficientes de correlación fueron superiores a 0,9 para los aminoácidos glutámico, valina, leucina, fenilalanina y lisina 0,982, 0,935, 0,980, 0,968, 0,984, respectivamente, Barcina *et al.* (1995). También García-Palmer *et al.* (1997) y Bütikofer y Fuchs (1997) encontraron una alta correlación de la mayoría de los aminoácidos libres con el tiempo en quesos Mahón y Emmental, respectivamente.

Grierson (1985) utilizó las concentraciones de aminoácidos libres para predecir el tiempo de maduración del queso Cheddar, obteniendo buenos coeficientes de correlación

TABLA 4.11: Coeficientes de correlación de los aminoácidos libres con el tiempo de maduración para los quesos Manchegos elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes (lotes 1, 2 y 3).

| aminoácido | LOTE 1 | LOTE 2 | LOTE 3 |
|------------|--------------|--------------|--------------|
| Asp | 0,980 | 0,244 | 0,011 |
| Thr | 0,996 | 0,089 | 0,449 |
| Ser | 0,988 | 0,710 | 0,811 |
| Glu | 0,971 | 0,882 | 0,661 |
| Pro | 0,939 | 0,909 | 0,964 |
| Gly | 0,963 | 0,919 | 0,905 |
| Ala | 0,954 | 0,472 | 0,748 |
| Cys | 0,923 | 0,817 | 0,805 |
| Val | 0,994 | 0,954 | 0,880 |
| Met | 0,965 | 0,665 | 0,680 |
| Ile | 0,938 | 0,496 | 0,760 |
| Leu | 0,992 | 0,939 | 0,921 |
| Tyr | 0,988 | 0,413 | 0,911 |
| Phe | 0,997 | 0,897 | 0,833 |
| His | 0,977 | 0,814 | 0,880 |
| Lys | 0,954 | 0,779 | 0,748 |
| NH3 | 0,974 | 0,819 | 0,419 |
| Arg | -0,678 | -0,245 | 0,051 |

para los ácidos glutámico (0,90), fenilalanina (0,94) y prolina (0,91). En este estudio se observó que la concentración de aminoácidos era un buen indicador de la maduración del queso Cheddar, aunque no pudo predecirse con precisión el tiempo de maduración de las muestras.

4.3.7. Análisis sensorial

En las Tablas 4.12 (A) y 4.12 (B) se presentan los resultados obtenidos de aplicar el análisis estadístico de comparación de medias a las puntuaciones dadas por los catadores o jueces a las muestras de queso evaluadas, considerando como factor el lote y el tiempo de maduración, respectivamente.

A la vista de estos resultados se puede decir que desde el punto de vista sensorial, apenas existieron diferencias significativas entre las muestras de los diferentes lotes de quesos entre sí (Tabla 4.12 (A)) a excepción de los atributos de fragilidad y de elasticidad, para los cuales las muestras de quesos elaborados con el cultivo iniciador 1 fueron significativamente diferentes al resto (más frágiles y menos elásticas). También hubo diferencias significativas entre los tres lotes para el atributo salado a los 120 y a los 150 días. Cabe decir que, en general, los quesos que recibieron una mayor puntuación para la calidad y la intensidad del olor y para la impresión global fueron los quesos de los lotes 1 y 2, y especialmente los del lote 1. Aunque las diferencias para la impresión global no fueron significativas para las fechas de maduración intermedias, sí lo fueron al principio (60 días) y al final de la maduración (150 días).

En cuanto al estudio realizado considerando las muestras con distintos tiempos de maduración (Tabla 4.12(B)) fueron las muestras de queso del lote 3 las que presentaron diferencias significativas en un mayor número de atributos.

Al comparar las puntuaciones otorgadas por los jueces para las muestras de diferentes tiempos de maduración, dentro de cada lote, se observó que tanto la intensidad del olor como la calidad del olor, aumentaron progresivamente conforme avanzaba el tiempo de maduración, en los tres lotes de quesos. Sin embargo, sólo se encontraron diferencias significativas en el caso de la intensidad del olor, en las muestras de quesos del lote 1.

En cuanto a los atributos de textura evaluados (dureza, fragilidad y elasticidad), cabe destacar que las muestras con un mayor tiempo de maduración presentaron

Tabla 4.12 (A): Puntuaciones medias de los atributos sensoriales de las muestras de quesos Manchegos elaborados con tres cultivos iniciadores distintos (lotes 1, 2 y 3), evaluadas a los 60, 90, 120 y 150 días de maduración.

| ATRIBUTO | 60 d | | | 90 d | | | 120 d | | | 150 d | | |
|-------------|------------------|--------------------|------------------|------|-----|-----|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|
| | Lote | | | Lote | | | Lote | | | Lote | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| int. Olor | 4,7 | 4,6 | 3,7 | 5,5 | 4,9 | 4,3 | 6,2 | 5,9 | 4,3 | 7,2 ^a | 6,2 ^b | 5,7 ^b |
| alid. Olor | 5,4 | 5,5 | 3,9 | 5,3 | 5,0 | 4,6 | 6,0 | 6,0 | 5,5 | 6,5 | 6,0 | 5,9 |
| dureza | 4,6 | 3,9 | 3,6 | 5,1 | 4,5 | 3,6 | 5,2 | 5,8 | 4,9 | 5,4 | 5,7 | 6,8 |
| ragilidad | 4,4 ^a | 3,1 ^b | 2,7 ^b | 3,7 | 3,5 | 2,1 | 3,5 | 4,5 | 2,9 | 5,4 | 5,2 | 6,3 |
| elasticidad | 2,0 ^a | 2,6 ^b | 2,7 ^b | 1,7 | 1,4 | 2,6 | 1,7 | 1,8 | 1,3 | 1,1 | 0,8 | 0,6 |
| adherencia | 4,6 | 5,4 | 5,2 | 4,8 | 5,0 | 4,9 | 4,7 | 6,1 | 4,9 | 4,9 | 4,4 | 4,6 |
| pastoso | 5,1 | 4,8 | 4,8 | 5,3 | 5,3 | 4,0 | 5,0 | 5,4 | 4,8 | 5,2 | 5,2 | 5,9 |
| grasiento | 4,4 | 3,9 | 3,7 | 4,0 | 4,1 | 3,6 | 5,2 | 5,0 | 5,5 | 5,7 | 4,9 | 4,7 |
| con agua | 2,7 | 3,6 | 4,5 | 2,8 | 2,6 | 3,7 | 1,7 | 2,3 | 1,6 | 2,0 | 3,1 | 2,1 |
| picante | 2,2 | 1,4 | 1,3 | 3,1 | 1,7 | 1,5 | 2,7 | 2,7 | 1,7 | 2,8 | 2,1 | 2,9 |
| ácido | 4,5 | 4,4 | 6,1 | 5,0 | 5,0 | 5,3 | 4,7 | 4,2 | 4,6 | 4,9 | 4,9 | 6,5 |
| salado | 5,0 | 6,9 | 5,8 | 5,4 | 7,0 | 4,9 | 5,8 ^a | 7,1 ^b | 5,5 ^c | 6,1 ^a | 7,4 ^{a,b} | 8,4 ^b |
| amargo | 3,5 | 2,6 | 5,5 | 3,5 | 2,9 | 4,2 | 4,9 | 3,7 | 4,3 | 4,1 | 4,8 | 5,0 |
| np. global | 5,9 ^a | 4,9 ^{a,b} | 2,6 ^b | 4,8 | 4,4 | 4,5 | 5,9 | 5,6 | 5,2 | 6,0 ^a | 5,3 ^{a,b} | 4,0 ^b |

¹: Cada valor corresponde a la media del análisis por duplicado.

^{a, b}: Medias en la misma **fila** con superíndices distintos, para cada tiempo de maduración, son significativamente diferentes entre sí según el test de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Tabla 4.12 (B): Puntuaciones medias de los atributos sensoriales de las muestras de quesos Manchegos evaluadas a los 60, 90, 120 y 150 días de maduración, elaborados con tres cultivos iniciadores distintos (lotes 1, 2 y 3)

| ATRIBUTO | LOTE 1 | | | | LOTE 2 | | | | LOTE 3 | | | |
|-------------|-------------------------|--------------------|--------------------|------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|------------------|-------------------------|--------------------|------------------|------------------|
| | tiempo de maduración(d) | | | | tiempo de maduración(d) | | | | tiempo de maduración(d) | | | |
| | 60 | 90 | 120 | 150 | 60 | 90 | 120 | 150 | 60 | 90 | 120 | 150 |
| int. Olor | 4,7 ^a | 5,5 ^{a,b} | 6,2 ^{a,b} | 7,2 ^b | 4,6 | 4,9 | 5,9 | 6,2 | 3,7 | 4,3 | 4,3 | 5,7 |
| calid. Olor | 5,4 | 5,3 | 6,0 | 6,5 | 5,5 | 5,0 | 6,0 | 6,0 | 3,9 | 4,6 | 5,5 | 5,9 |
| dureza | 4,6 | 5,1 | 5,2 | 5,4 | 3,9 | 4,5 | 5,8 | 5,7 | 3,6 ^a | 3,6 ^a | 4,9 ^a | 6,8 ^b |
| fragilidad | 4,4 ^{a,b} | 3,7 ^a | 3,5 ^a | 5,4 ^b | 3,1 ^a | 3,5 ^{a,b} | 4,5 ^{a,b} | 5,2 ^b | 2,7 ^a | 2,1 ^a | 2,9 ^a | 6,3 ^b |
| elasticidad | 2,0 ^a | 1,7 ^{a,b} | 1,7 ^{a,b} | 1,1 ^b | 2,6 | 1,4 | 1,8 | 0,8 | 2,7 | 2,6 | 1,3 | 0,6 |
| adherencia | 4,6 | 4,8 | 4,7 | 4,9 | 5,4 | 5,0 | 6,1 | 4,4 | 5,2 | 4,9 | 4,9 | 4,6 |
| pastoso | 5,1 | 5,3 | 5,0 | 5,2 | 4,8 | 5,3 | 5,4 | 5,2 | 4,8 ^a | 4,0 ^b | 4,8 ^a | 5,9 ^c |
| grasiento | 4,4 | 4,0 | 5,2 | 5,7 | 3,9 | 4,1 | 5,0 | 4,9 | 3,7 ^a | 3,6 ^a | 5,5 ^b | 4,7 ^c |
| con agua | 2,7 | 2,8 | 1,7 | 2,0 | 3,6 | 2,6 | 2,3 | 3,1 | 4,5 | 3,7 | 1,6 | 2,1 |
| picante | 2,2 | 3,1 | 2,7 | 2,8 | 1,4 | 1,7 | 2,7 | 2,1 | 1,3 | 1,5 | 1,7 | 2,9 |
| ácido | 4,5 | 5,0 | 4,7 | 4,9 | 4,4 | 5,0 | 4,2 | 4,9 | 6,1 ^a | 5,3 ^{a,b} | 4,6 ^b | 6,5 ^a |
| salado | 5,0 | 5,4 | 5,8 | 6,1 | 6,9 | 7,0 | 7,1 | 7,4 | 5,8 | 4,9 | 5,5 | 8,4 |
| amargo | 3,5 | 3,5 | 4,9 | 4,1 | 2,6 | 2,9 | 3,7 | 4,8 | 5,5 | 4,2 | 4,3 | 5,0 |
| Imp. global | 5,9 | 4,8 | 5,9 | 6,0 | 4,9 | 4,4 | 5,6 | 5,3 | 2,6 | 4,5 | 5,2 | 4,0 |

¹: Cada valor corresponde a la media del análisis por duplicado.

^{a, b}: Medias en la misma **fila** con superíndices distintos, dentro de cada lote, son significativamente diferentes entre sí según el test de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

puntuaciones más elevadas para la dureza y la fragilidad, respecto a las muestras con un menor tiempo de maduración. Las muestras de 150 días de maduración correspondientes al lote 3, fueron las más duras, según evaluaron los jueces. De forma inversa, la elasticidad presentó una tendencia a disminuir conforme avanzaba la maduración, existiendo diferencias significativas entre los distintos tiempos sólo para los quesos del lote 1. Los atributos pastoso, grasiento, ácido y salado aumentaron desde el principio hasta el final de la maduración.

Se aplicó el ACP a las puntuaciones medias dadas por los catadores a las distintas muestras de quesos. En la Tabla 4.13 se muestran los resultados de este análisis.

Los tres primeros CP explicaron un 77,20% de la varianza total. Las variables más correlacionadas con el CP 1 fueron el carácter grasiento, la calidad del olor, la presencia de agua y la intensidad del olor. Por otro lado el CP 2 estuvo más correlacionado con el atributo salado.

En la Figura 4.33 se muestra la distribución de las muestras obtenida al representar el eje CP 1 frente al CP 2. En líneas generales se puede destacar, que a lo largo del eje CP 1 las muestras se distribuyeron según su tiempo de maduración. Así, las muestras de 60 y 90 días se encuentran en la parte negativa del eje, mientras que las muestras de 120 y 150 días están situadas en la parte positiva del mismo. Esto quiere decir que, las muestras menos maduras poseen una menor calidad del olor, y son menos grasientas para los catadores que las más maduras, y también poseen un mayor contenido en agua. Por otro lado, las muestras se distribuyeron a lo largo del CP 2 fundamentalmente según su sabor salado.

A la vista de los resultados obtenidos del análisis sensorial se puede decir, que si bien las diferencias entre lotes obtenidas tras aplicar el ANOVA sólo fueron significativas en algunos casos, se observó que las puntuaciones para la intensidad del olor, la calidad del olor y la impresión global fueron mayores para los quesos del lote 1, seguidos de los del lote 2 (Tabla 4.12), ambos elaborados con los cultivos iniciadores definidos, obteniendo las muestras del lote 3 (elaboradas con el cultivo mixto comercial) las

TABLA 4.13: Resultados del Análisis de Componentes Principales de las puntuaciones otorgadas por los catadores a los quesos Manchegos de 15, 45, 90 y 150 días de maduración elaborados con tres cultivos iniciadores diferentes.

| Componente Principal | Varianza explicada (%) | Varianza total (%) | Variables altamente correlacionadas con los CP y sus coeficientes | |
|----------------------|------------------------|--------------------|--|--|
| 1 | 48,29 | 48,29 | Grasiento (0,929) Calidad olor (0,901) Con agua (-0,895) Intens. olor (0,838) | |
| 2 | 17,16 | 65,45 | Salado (0,894) | |
| 3 | 11,74 | 77,20 | Amargo (0,871) Ácido (0,804) | |

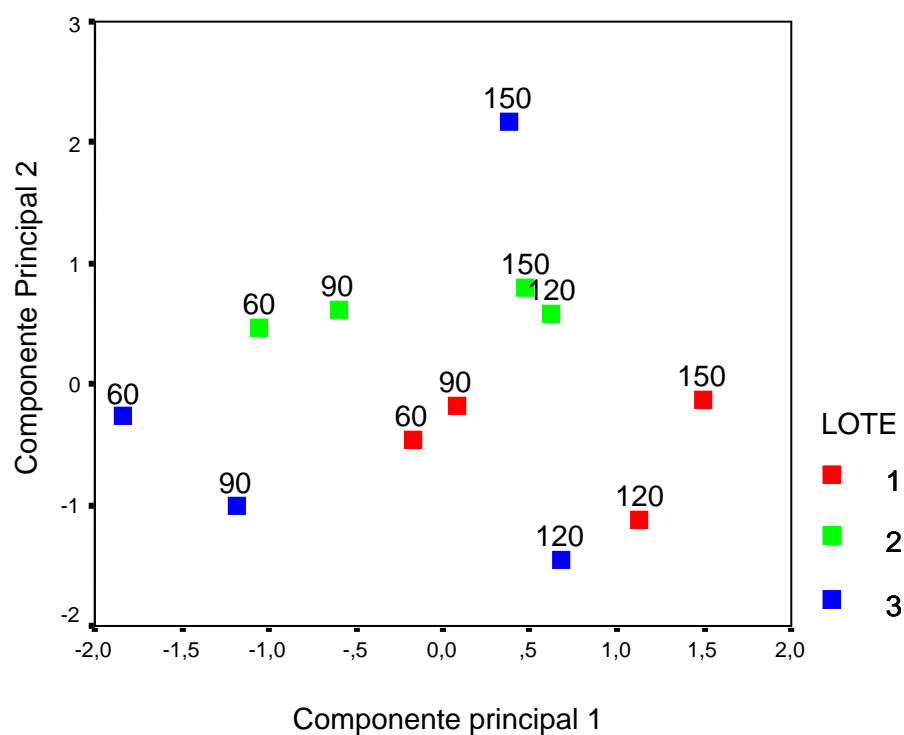


Figura 4.33: Representación de las muestras en el plano definido por los dos primeros Componentes Principales obtenidos del ACP según los resultados del Análisis Sensorial

puntuaciones más bajas. Lo mismo sucedió al aplicar el ACP, el cual diferenció poco a las muestras por lotes (Figura 4.33). De estos resultados se podría concluir que, en las fechas de maduración estudiadas los jueces no fueron capaces de apreciar grandes diferencias entre los quesos elaborados con los distintos cultivos iniciadores, y que quizás los mayores cambios empezarían a apreciarse desde el punto de vista sensorial a partir de los 5 meses de maduración.

González-Viñas *et al.* (2001b), en un estudio realizado sobre los cambios experimentados en las características sensoriales del queso Manchego a lo largo de la maduración, comprobaron que para poder detectar cambios aparentes en el queso, se necesitaba un tiempo mínimo de 4 ó 5 meses de maduración.

4.4. CONCLUSIONES

1. Los recuentos microbianos del género *Lactobacillus* en los lotes de queso 1 y 3 (en los que no formaban parte del cultivo iniciador) sólo fueron nulos al principio de la maduración, alcanzando niveles de 10^6 - 10^7 a los 90 días, manteniéndose más o menos estables hasta el final de la maduración (150 días). Los recuentos de *Lactobacillus* en los quesos del lote 2 (en los cuales habían sido añadidos expresamente como parte del cultivo iniciador) fueron superiores a los de los otros dos lotes en todas las fechas de maduración estudiadas.
2. En general, se encontraron pocas diferencias significativas en los parámetros físico-químicos y en las fracciones nitrogenadas entre los tres lotes de quesos elaborados con los distintos cultivos iniciadores. Sí hubo diferencias significativas entre las muestras de queso con distintos tiempos de maduración, sobre todo para el extracto seco, el pH y la actividad del agua, así como para las fracciones nitrogenadas.
3. El análisis estadístico multivariante del análisis de péptidos por RP-HPLC, basado en el reconocimiento de los picos utilizando como variables la altura de los picos, resultó ser un método eficaz para evaluar el efecto de los diferentes *starters* en la proteólisis del queso Manchego.
4. Las muestras de queso con un mismo tiempo de maduración (90 días) presentaron un perfil de péptidos de la fracción de NS insoluble en etanol al 70% diferente según el cultivo iniciador empleado en su fabricación. Así, al aplicar el Análisis de Componentes Principales, las muestras se separaron en tres grupos, que coincidían con los tres lotes de quesos elaborados cada uno con un cultivo iniciador diferente. Estos resultados fueron corroborados por el análisis de Conglomerados.
5. Lo mismo sucedió en el caso de los péptidos de la fracción de NS soluble en etanol al 70% de las muestras de 90 días, clasificándose las muestras de nuevo en los tres grupos correspondientes a los tres cultivos iniciadores diferentes, tanto en el Análisis de Componentes Principales como en el Análisis de Conglomerados.

6. Al aplicar el Análisis de Componentes Principales a los perfiles peptídicos de la fracción de NS soluble en etanol al 70% de las muestras con distintos tiempos de maduración, éstas se agruparon en muestras de bajo, medio y largo tiempo de maduración. También se observó un agrupamiento similar en el caso del Análisis de Conglomerados.
7. Los aminoácidos libres mayoritarios encontrados en el queso Manchego fueron glutámico, leucina, valina, isoleucina, lisina y fenilalanina. En general, los aminoácidos aumentaron a medida que lo hacía el tiempo de maduración de los quesos.
8. Las muestras de los quesos Manchegos elaborados con tres cultivos iniciadores distintos se diferenciaron significativamente entre lotes en cuanto a su contenido en los aminoácidos aspártico, glutámico, cisteína, tirosina y arginina.
9. El Análisis de Componentes Principales aplicado a la concentración de aminoácidos libres individuales de los quesos de 90 días de maduración clasificó a las muestras en los tres grupos correspondientes a los tres lotes de quesos elaborados con cultivos iniciadores diferentes. Por otro lado, el Análisis de Componentes Principales aplicado a las muestras de distintos tiempos de maduración, también separó las muestras de queso en 4 grupos, correspondientes a cada una de las fechas de maduración estudiadas.
10. En los tres lotes de quesos analizados se obtuvieron buenos coeficientes de correlación con el tiempo de maduración para los aminoácidos prolina, glicina, valina, leucina, fenilalanina e histidina.
11. El Análisis de Componentes Principales aplicado a las puntuaciones otorgadas por los catadores a los quesos Manchegos de los distintos tiempos de maduración y elaborados con los tres cultivos iniciadores diferentes puso de manifiesto que los atributos que más contribuyeron a separar las muestras fueron el carácter grasiento, la calidad del olor y la intensidad del olor, siendo las muestras con mayor tiempo de

maduración las que presentaron las puntuaciones más altas para dichos atributos. En todas las fechas de maduración consideradas, la impresión global resultó ser mejor para los quesos de los lotes 1 y 2, elaborados con los cultivos iniciadores definidos, que contenían las especies *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* y *Lactobacillus plantarum*, las cuales habían sido aisladas de quesos Manchegos artesanales.

4.5. BIBLIOGRAFÍA

- Accolas, J. P., Heme, D., Desmazeaud, M. J., Vassal, L., Bouillanne, C. y Veaux, M. (1980). *Le Lait* 60, 487-524.
- Ali, L. A. M. (1960). The amino acid content of Edam cheese. *Meded. Landbouwhogeschool Wageningen* 60, 1.
- Andrews, A. T. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research* 50, 45-55.
- AOAC: Official Methods of Analysis. (1995). 13th edition. Washington D. C.
- APHA (1976). Recommended Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Association, Washington, USA.
- Barcina, Y., Ibáñez, F. C. y Ordóñez, A. I. (1995). Evolution of free amino acids during Idiazábal cheese ripening. *Food Control* 6, 161-164.
- Bartels, H. J., Jonhson, M. E. y Olson, M. F. (1987). Accelerated ripening of Gouda cheese. 2. Effect of freeze-shocked *Lactobacillus helveticus* on proteolysis and flavour development. *Milchwissenschaft* 42, 83-88.
- Beresford, T., Peláez, C. y Jimeno, J. (1998). Nature and growth of non starter flora. *Proceedings COST Action 95. Improvement of the quality of the production of raw milk cheeses*, 225-238.
- Blakesley, R. W. y Boezi, J. A. (1977). A new staining technique for proteins in polyacrilamide gels using Coomassie Brilliant Blue G 250. *Analytical Biochemistry* 82, 580-581.
- Bouton, Y. y Grappin, R. (1995). Comparaison de la qualité de fromages à pâte pressée cuite fabriqués à partir de lait cru ou microfiltré. *Lait* 75, 31-44.
- Bütikofer, U. y Fuchs, D. (1997). Development of free amino acids in Appenzeller, Emmentaler, Gruyère, Raclette, Sbrinz and Tilsiter cheese. *Lait* 77, 91-100.

- Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P., Fernández, I., Gómez, J., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M. y Rodríguez, E. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research* 64, 409-421.
- COST 95 (1999). A guide for the sensory evaluation of the texture of hard and semi-hard ewe's milk cheeses. Ed. Cresson. European Commission, B-1049. Brussels.
- Desmazeaud, M. J. y Gripon, J. C. (1977). General mechanisms of protein breakdown during cheese ripening. *Michwissenshaft* 32, 731-734.
- Devoyod, J. J. y Muller, M. (1969). Le flore microbienne du fromage de Roquefort. III. Les streptocoques lactiques et les *Leuconostoc*. Influence de différents microorganismes de contamination. *Le Lait* 49, 369-399.
- Devoyod, J. J. y Poullain, F. (1988). The *Leuconostocs*. Characteristics: their role in dairy technology. *Le Lait* 68, 249-280.
- Dilanian, Z. C. (1980). Cheese manufacturing by intensified lactic fermentation of the milk and melting of the curd. *Milchwissenshaft* 35, 614-616.
- El Soda, M. y Desmazeaud, M. J. (1982). Les peptide-hydrolases des *Lactobacillus* du groupe *Thermobacterium* . I. Mise en evidence des ces activités chez *Lactobacillus helveticus* , *L. acidophilus*, *L. lactis* et *L. bulgaricus*. *Can Microbiol.* 28, 1181-1188.
- El Soda, M., Desmazeaud, M. J. y Bergère, J. L. (1978). Peptide hydrolases of *Lactobacillus casei*: isolation and general properties of various peptidases activities. *Journal of Dairy Research* 45, 445-455.
- El Soda, M., Fathallah, S., Ezzat, N., Desmazeaud, M. J. y Abou Donia, S. (1986). The esterolytic and lipolytic activities of Lactobacilli . Detection of the esterase systems of *Lactobacillus casei*, *Lactob. plantarum*, *Lactob. brevis* and *Lactob. fermentum*. *Science des Aliments* 6, 545-557.

- El Soda, M., Said, H., Desmazeaud, M. J., Mashaly, R. y Ismail, A. (1983). The intracellular peptide-hydrolases of *Lactobacillus plantarum*. Comparison with *Lactobacillus casei*. *Le Lait* 63, 1-14.
- Fontecha J., Peláez, C. y Juárez, M. (1994). Biochemical characteristics of a semi-hard ewe's milk cheese. *Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung Forschung* 198, 24-28.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. y Lynch, C. M. (1998). Significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* 53, 83-89.
- Frau, M., Massanet, J., Rosselló, C., Simal, S. y Cañellas, J. (1997). Evolution of free amino acid content during ripening of Mahón cheese. *Food Chemistry* 60, 651-657.
- García, A., Palop, M. L. y Cabezas, L. (1997). Properties of lactic acid bacteria isolated from Manchego cheeses suitable for industrial applications. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 15, 237-240.
- García, A., Cabezas, L. y Palop, M. L. (1995). Identificación de la flora láctica en quesos de Denominación de Origen "Manchego". *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 13, 275-280.
- García-Palmer, J., Serra, N., Palou, A. y Gianotti, M. (1997). Free amino acids as indices of Mahón cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 80, 1908-1917.
- García-Ruiz, A., Cabezas, L., Martín-Álvarez, P. J. y Cabezudo, M. D. (1998). Prediction of the ripening times of Manchego cheese using multivariate statistical analyse: a preliminary study. *Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung Forschung A* 206, 382-386.
- Gaya, P., Medina, M., Rodríguez-Marín, M. A. y Núñez, M. (1990). Accelerated ripening of ewes' milk Manchego cheese: the effect of elevated ripening temperatures. *Journal of Dairy Science* 73, 26-32.
- Gómez, M. J., Rodríguez, E., Gaya, P., Núñez, M. y Medina, M. (1999). Characteristics of Manchego cheese manufactured from raw and pasteurized ovine milk and with defined-strain or commercial mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science* 82, 2300-2307.

- Gómez, M. J., Gaya, P., Núñez, M. y Medina, M. (1996a). Effect of *Lactobacillus plantarum* as adjunct starter on the flavour and texture of a semi-hard cheese made from pasteurized cows' milk. *Lait* 76, 461-472.
- Gómez, M. J., Gaya, P., Núñez, M. y Medina, M. (1996b). Debittering activity of peptidases from selected lactobacilli strains in model cheeses. *Milchwissenschaft* 51, 315-319.
- González-Viñas, M. A., Poveda, J. M. y Cabezas, L. (2001 a). Sensory and chemical evaluation of Manchego cheese and other cheese varieties available in the Spanish market. *Journal of Food Quality* 24, 157-165.
- González-Viñas, M. A., Poveda, J. M., García-Ruiz, A. y Cabezas, L. (2001 b). Changes in chemical, sensory and rheological characteristics of Manchego cheeses during ripening. *Journal of Sensory Studies* 16, 361-371.
- Grierson, G. R. (1985). The liberation of water soluble nitrogen during cheese ripening. *South African Journal of Dairy Technology* 17, 71.
- Hickey, M. W., Van Leeuwen, H., Hilier, A. J. y Jago, G. R. (1983). Amino acid accumulation in Cheddar cheese manufactured from normal and ultrafiltered milk. *Australian Journal of Dairy Technology* 9, 110.
- Hintz, P. C., Slater, W. C. y Harper, W. J. (1956). A survey of various free amino and fatty acids in domestic Swiss cheese. *Journal of Dairy Science* 39, 235.
- ISO 11036 (1994). Sensory Analysis. Methodology. Texture profile.
- ISO 6564 (1985). Sensory Analysis. Methodology. Flavour profile methods.
- ISO 8589 (1988). Sensory Analysis. Guide for the installation of a chamber for sensory analysis.
- Johansen, E. y Kibenich, A. (1992). Characterization of *Leuconostoc* isolates from commercial mixed strain mesophilic starter cultures. *Journal of Dairy Science* 75, 1186-1191.

- Khalid, N. M. y Marth, E. H. (1990). *Lactobacilli*-Their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: A review. *Journal of Dairy Science* 73, 2669-2684.
- Kirimura, J., Shimizu, A., Kimizuka, A., Ninomiya, T. y Katsuya, N. (1969). The contribution of peptides and amino acids to the taste of food-stuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 17, 689-695.
- Lane, C. N. y Fox, P. F. (1996). Contribution of starter and adjunct lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal* 6, 715-728.
- Lau, K. Y., Barbano, D. M. y Rasmussen, R. R. (1991). Influence of pasteurization of milk on protein breakdown in Cheddar cheese during aging. *Journal of Dairy Science* 74, 727-740.
- Lavanchy, P. y Sieber, R. (1993). Proteolysis in different hard and semihard cheeses. I. Free amino acids. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung* 22, 59-64.
- Law, B. A., Castanon, M. J. y Sharpe, M. E. (1976). The contribution of starter streptococci to flavour development in cheddar cheese. *Journal of Dairy Research* 43, 301-311.
- Lemieux, L. y Simard, E. R. (1992). Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. *Le Lait* 72, 335-382.
- Lemieux, L., Puchades, R. y Simard, E. R. (1989). Size-exclusion HPLC separation of bitter and astringent fractions from Cheddar cheese made with added *Lactobacillus* strains to accelerate ripening. *Journal of Food Science* 54, 1234-1237.
- Lynch, C. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cogan, T. M. y Drinan, F. D. (1996). Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal* 6, 851-867.
- Lynch, C. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cogan, T. M. y Drinan, F. D. (1997). Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait* 77, 441-459.

- Marcos, A., Fernández-Salguero, J. y Esteban, M. A. (1978). Hidrólisis relativa de las caseínas del queso tipo Manchego maduro y primeros productos de su degradación proteolítica. *Archivos de Zootecnia* 27, 341-350.
- Martley, F. G. y Lawrence, R. C. (1972). Cheddar cheese flavour. II: characteristics of single strain starters associated with good or poor flavour development. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 7, 38-50.
- McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Lucey, J. A., Jordan, K. N. y Cogan, T. M. (1993). Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 3, 613-634.
- McSweeney, P. L. H., Walsh, E. M., Fox, P. F., Cogan, T. M., Drinan, F. D. y Castelo-González, M. (1994). A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 33, 183-192.
- Mendía, C., Ibáñez, F. J.; Torre, P. y Barcina, Y. (2000). Effect of pasteurization and use of a native starter culture on proteolysis in a ewes' milk cheese. *Food Control* 11, 195-200.
- Monnet, V.; Chapot-Chartier, M. P. y Gripon, J. C. (1993). Les peptidasas des lactocoques. *Lait* 73, 97-108.
- Muir, D. D., Banks, J. M. y Hunter, E. A. (1996). Sensory properties of Cheddar cheese: Effect of starter type and adjunct. *International Dairy Journal* 6, 407-423.
- Mundt, J. O. (1986). Lactic acid Streptococci. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. II, PHA. Sneath. N. S. Mair, M. E. Sharpe y J.G. Holt. (eds). 1065-1066. Williams and Wilkins. Co. Baltimore. USA.
- Núñez, M. (1976). Flora microbiana del queso Manchego: IV. *Leuconostoc*. *Anales del INIA, Serie General* 4, 67-74.
- Núñez, M., Medina, M. y Gaya, P. (1989). Ewes' milk cheese: technology, microbiology and chemistry. *Journal of Dairy Research* 56, 303-321.

- Ordóñez, J. A. y Burgos, J. (1977). Étude de la variété de fromage Ulloa. III. Acides aminés libérés pendant la maturation. *Lait* 567, 416.
- Ordóñez, J. A. y Burgos, J. (1980). Free amino acids of Manchego cheese ripened in olive oil. *Milchwissenschaft* 35, 69-71.
- Peterson, S. D. y Marshall, R. T. (1990). Non starter lactobacilli in Cheddar cheese: a review. *Journal of Dairy Science* 73, 1395-1410.
- Picón, A., Gaya, M., Medina, M y Núñez, M. (1995). The effect of liposome-encapsulated *Bacillus subtilis* neutral proteinase on Manchego cheese during ripening. *Journal of Dairy Science* 78, 1238-1247.
- Polo, C., Ramos, M. y Sánchez, R. (1985). Free amino acids by high performance liquid chromatography and peptides by gel electrophoresis in Mahón cheese during ripening. *Food Chemistry* 16, 85.
- Pripp, A. H., Shakeel-Ur-Rehman, McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (1999). Multivariate statistical analysis of peptide profiles and free amino acids to evaluate effects of single-strain starters on proteolysis in miniature Cheddar-type cheeses. *International Dairy Journal* 9, 473-479.
- Pritchard, G. G. y Coolbear, T. (1993). *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 179-206.
- Puchades, R., Lemieux, L. y Simard, R. E. (1989). Evolution of free amino acids during the ripening of Cheddar cheese containing added lactobacilli strains. *Journal of Food Science* 54, 885-888, 946.
- Ramos, M., Barneto, R. y Ordóñez, J. A. (1981). Evaluation of a specific starter for Manchego cheese production. *Milchwissenschaft* 36, 528-531.
- Sala-Trepat y Burgos, F. J. y Burgos, J. (1972). Maduración del queso de Cabrales: evolución de los aminoácidos libres durante la maduración. *Anales de Bromatología* 24, 61.

- Shalabi, S. I. y Fox, P. F. (1987). Electrophoretic analysis of cheese: comparison of methods. *Irish Journal of Food Science and Technology* 11, 135-151.
- SPSS Program for Windows (1999). Version 9.0.1.
- Terzaghi, B. E. y Sandine, W. E. (1975). Improved media for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology* 29, 807-813.
- Visser, F. M. W. (1977). Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 3. Protein breakdown: analysis of the soluble nitrogen and amino acid nitrogen fractions. *Netherland Milk Dairy Journal* 31, 210-239.
- Wallace, J. M. y Fox, P. F. (1997). Effect of adding free amino acids to Cheddar cheese curd on proteolysis, flavour and texture development. *International Dairy Journal* 7, 157-167.
- Weaver, J. C. y Kroger, M. (1978). Free amino acid and rheological measurements on hydrolized lactose Cheddar cheese during ripening. *Journal of Food Science* 43, 579.
- Wilkinson, M. G. (1993). Acceleration of cheese ripening. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, ed. P. F. Fox, Vol. 1. Elsevier Applied Science, London.